



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**OVĚŘENÍ PŘESNOSTI METODY STANOVENÍ VONNÝCH  
LÁTEK S ALERGENNÍMI ÚČINKY**

ACCURACY OF THE METHOD FOR ASSESSMENT OF ALLERGENIC AROMA COMPOUNDS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Matěj Rychetský**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

**BRNO 2019**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1428/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student: **Matěj Rychetský**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Ověření přesnosti metody stanovení vonných látek s alergenními účinky

### Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
  - vonné látky v potravinách – charakteristika, rozdělení
  - vonné látky s alergenními účinky
  - mikroextrakce pevnou fází, plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC–MS) – princip, popis, instrumentace
  - validace analytických metod
2. Ověřte opakovatelnost a reprodukovatelnost metody stanovení vonných látek s alergenními účinky

### Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Matěj Rychetský  
student(ka)

-----  
doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá ověřením přesnosti metody stanovení potenciálně alergenních vonných látek v cukrovinkách. V teoretické části jsou popsány syntetické i přírodní vonné látky, které se v potravinách vyskytují, důkladněji jsou popsány látky potenciálně alergenní. Dále je stručně charakterizována metoda mikroextrakce pevnou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií, která byla při měření použita. Nakonec jsou popsána základní kritéria měřená při validaci analytické metody.

V experimentální části byla ověřena opakovatelnost a reprodukovatelnost metody HS-SPME-GC-MS pro stanovení potenciálně alergenních vonných látek s použitím standardů vonných látek a vybraných vzorků kandytových cukrovinek.

Měřením bylo zjištěno, že použitá metoda je vhodná při kvalitativním stanovení (na základě retenčních časů), ovšem při kvantitativním stanovení (na základě ploch píků) metoda vykazuje menší přesnost, jejímu zlepšení budou věnovány následující experimenty.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

aromaticky aktivní látky, SPME, GC-MS, validace

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with the verification of the accuracy of the method for determination of potentially allergenic substances in confectionery. In the theoretical part the synthetic and natural fragrances, which are present in foodstuffs are described. Furthermore, the method of solid phase microextraction in connection with gas chromatography with mass spectrometry, which was used in the measurement, is briefly characterized. Finally, the basic criteria measured in the validation of the analytical method are described.

In the experimental part, the repeatability and reproducibility of the HS-SPME-GC-MS method for the determination of potentially allergenic substances in candy samples was verified.

It was found by the measurement that the used method is suitable for qualitative determination (based on retention times), but the method shows minor inaccuracies in quantitative determination (determination based on peaks area) and it will be improved in following experiments.

## **KEYWORDS**

aroma compounds, SPME, GC-MS, validation

RYCHETSKÝ, M. *Ověření přesnosti metody stanovení vonných látek s alergenními účinky*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 45 s. Vedoucí práce doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### *Poděkování:*

*Rád bych poděkoval vedoucí své bakalářské práce doc. Ing. Evě Vítové, Ph.D. za cenné rady při vypracování této bakalářské práce a za trpělivost s mojí prokrastinací. Dále bych chtěl poděkovat Bc. Adrienně Maňákové za spolupráci a pomoc při práci v laboratoři.*

## OBSAH

|  |    |
|--|----|
| 1. ÚVOD .....  | 8  |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST.....  | 9  |
| 2.1 Vonné látky v potravinách.....                                   | 9  |
| 2.1.1 Přírodní vonné látky .....                                     | 9  |
| 2.1.1.1 Přírodní vonné látky rostlinného původu.....                 | 9  |
| Materiály pro výrobu rostlinných vonných látek .....                 | 9  |
| 2.1.1.2 Přírodní vonné látky živočišného původu.....                 | 10 |
| 2.1.2 Syntetické vonné látky .....                                   | 10 |
| 2.1.2.1 Uhlovodíky .....   | 11 |
| 2.1.2.2 Alkoholy .....   | 11 |
| 2.1.2.3 Etery .....  | 11 |
| 2.1.2.4 Aldehydy.....  | 11 |
| 2.1.2.5 Ketony.....  | 12 |
| 2.1.2.6 Acetaly .....  | 12 |
| 2.1.2.7 Estery .....   | 12 |
| 2.1.2.8 Laktony .....  | 12 |
| 2.1.2.9 Fenoly .....   | 13 |
| 2.1.2.10 Aromatické látky obsahující dusík a síru.....               | 13 |
| 2.1.2.11 Látky s mošusovou vůní .....                                | 13 |
| 2.1.2.12 Ostatní vonné látky .....                                   | 13 |
| 2.2 Vonné látky s alergenními účinky .....                           | 13 |
| 2.2.1 Legislativa .....  | 13 |
| 2.2.2 Seznam potenciálně alergenních látek .....                     | 14 |
| 2.3 Použité metody a instrumentální techniky.....                    | 19 |
| 2.3.1 Mikroextrakce pevnou fází.....                                 | 19 |
| 2.3.1.1 Instrumentace .....  | 19 |
| 2.3.1.2 Princip extrakce .....                                       | 20 |
| 2.3.2 Plynová chromatografie .....                                   | 20 |
| 2.3.2.1 Instrumentace a princip GC .....                             | 21 |
| 2.3.3 Hmotnostní spektrometrie .....                                 | 22 |
| 2.3.3.1 Instrumentace MS .....                                       | 23 |
| 2.3.4 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie..... | 23 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.4     | Validace analytických metod.....   | 24 |
| 2.4.1   | Mez detekce.....   | 24 |
| 2.4.2   | Mez stanovitelnosti .....  | 24 |
| 2.4.3   | Přesnost měření .....  | 24 |
| 2.4.3.1 | Pravdivost měření .....  | 24 |
| 2.4.3.2 | Preciznost měření.....   | 24 |
| 2.4.4   | Linearita měření .....   | 25 |
| 2.4.5   | Robustnost měření.....   | 25 |
| 2.4.6   | Nejistota měření .....   | 25 |
| 2.4.7   | Výtěžnost.....   | 25 |
| 3.      | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....   | 26 |
| 3.1     | Laboratorní vybavení a chemikálie .....                                      | 26 |
| 3.1.1   | Plyny.....   | 26 |
| 3.1.2   | Přístroje .....  | 26 |
| 3.1.3   | Pracovní pomůcky.....  | 26 |
| 3.1.4   | Chemikálie .....   | 26 |
| 3.2     | Analyzované vzorky .....   | 26 |
| 3.3     | Použité metody a experimentální postupy .....                                | 27 |
| 3.3.1   | Metoda HS-SPME-GC-MS.....  | 27 |
| 3.3.1.1 | Podmínky SPME extrakce .....   | 28 |
| 3.3.1.2 | Podmínky GC-MS analýzy .....   | 28 |
| 3.3.1.3 | Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků HS-SPME-GC-MS analýzy<br>..... | 28 |
| 4.      | VÝSLEDKY A DISKUSE.....  | 29 |
| 4.1     | Opakovatelnost použité metody .....  | 29 |
| 4.1.1   | Opakovatelnost metody při měření standardů alergenních vonných látek .....   | 29 |
| 4.1.2   | Opakovatelnost metody při měření vzorků cukrovinek .....                     | 29 |
| 4.2     | Reprodukovatelnost použité metody .....                                      | 30 |
| 4.2.1   | Reprodukovatelnost metody při měření standardů alergenních vonných látek .   | 30 |
| 4.2.2   | Reprodukovatelnost metody při měření vzorků cukrovinek .....                 | 30 |
| 5.      | ZÁVĚR.....   | 38 |
| 6.      | SEZNAM LITERÁRNÍCH ZDROJŮ .....  | 39 |
| 6.1     | Zdroje použitých obrázků.....  | 41 |

|    |   |    |
|----|---|----|
| 7. | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ..... | 42 |
| 8. | SEZNAM PŘÍLOH .....                     | 43 |
| 9. | PŘÍLOHY .....                           | 44 |

## 1. ÚVOD

I když je v současnosti snaha snižovat použití aditivních látek v potravinách, stále je jejich výskyt v potravinách značný. Mezi aditivní látky řadíme všechny látky, které se do potravin přidávají za účelem zlepšení jejich textury, trvanlivosti a zejména pak chuti a vůně.

Za vylepšení chuti a vůně jsou zodpovědné vonné látky, které mohou být získány jak z přírodních zdrojů, tak i syntetickou cestou. Mezi vonnými látkami však můžeme najít látky, které mohou negativně ovlivnit zdraví lidí, kteří s těmito látkami přijdou do kontaktu, a sice mohou u některých jedinců způsobit alergické reakce. V současnosti je takto pohlíženo na 26 potenciálně alergenních látek, i přesto není jejich použití v potravinách v České republice žádným způsobem legislativně regulováno. Současná legislativa pamatuje pouze na jejich použití v kosmetických přípravcích, kde je použití těchto potenciálních alergenů limitováno.

Každopádně je žádoucí mít k dispozici, pokud možno jednoduchou, rychlou a přesnou metodu pro jejich stanovení v kosmetických přípravcích i v potravinách. Cílem této práce bylo ověřit opakovatelnost a reprodukovatelnost metody stanovení alergenních vonných látek založené na použití mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (HS-SPME-GC-MS).



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Vonné látky v potravinách

Vonnými látkami rozumíme takové látky, které působí na receptory čichu a u člověka vyvolávají dojem vůně (aroma). V případě, že mimo působení na čichové receptory látky působí i na receptory chuťové, hovoříme o chuťových látkách. Pouze ve velmi malém množství případů je vůně určitého typu potraviny způsobena pouze jednou konkrétní vonnou látkou, v takovém případě hovoříme o tzv. klíčové složce vůně. Ve velké většině případů se na výsledné vůni podílí větší množství látek [1, 2].

Vonné látky lze rozdělit dle jejich původu do dvou skupin – přírodní a syntetické. Obě tyto skupiny můžeme dále rozdělit vždy na dvě podskupiny. Přírodní vonné látky na látky živočišného nebo rostlinného původu. Syntetické vonné látky na látky přírodně identické a umělé [1, 3].

#### 2.1.1 Přírodní vonné látky

Mezi přírodní vonné látky řadíme takové látky, které v tělech rostlin a živočichů vznikají následkem sekundárních metabolických dějů. Dále do této skupiny řadíme vonné látky, které vznikly během technologického procesu zpracování [4, 5].

##### 2.1.1.1 Přírodní vonné látky rostlinného původu

Vonné látky v těle rostlin vznikají rozkladem vysokomolekulárních produktů primárního metabolismu (tuky, cukry, bílkoviny), za předpokladu jejich dostatku. Existují dva způsoby, jakými dochází ke vzniku vonných látek v těle rostlin [5, 7].

Aromatické látky (ve smyslu látek obsahujících aromatické jádro) vznikají během tzv. šikimátové dráhy. Tato dráha byla pojmenována podle kyseliny šikimové, která je jedním z jejích meziproductů. Šikimátová dráha je řada několika reakcí, které vycházejí z výchozích látek erytroso-4-fosfátu a fosfoenolpyruvátu, což jsou látky, které vznikají během fotosyntetické syntézy sacharidů. Výslednými produkty této dráhy jsou aromatické aminokyseliny tyrosin a fenylalanin. Následně poté deaminací fenylalaninu dochází ke vzniku kyseliny skořicové, z níž vznikají další vonné látky [8, 9].

Druhým způsobem, jakým mohou vonné látky v těle rostliny vznikat, je mevalonátová dráha pojmenovaná podle kyseliny mevalonové, což je jeden z meziproductů, který během této dráhy vzniká. Jedná se o enzymaticky řízenou reakci, kdy dochází ke kondenzaci izoprenových jednotek a následně přes řadu meziproductů ke vzniku prekursorů terpenů a terpenických látek obsažených v silicích [5].

#### Materiály pro výrobu rostlinných vonných látek

Nejčastějším zdrojem pro výrobu vonných látek z rostlin jsou **silice**, někdy také nazývané éterické či esenciální oleje. Jedná se obvykle o ve vodě nerozpustné, těkavé kapaliny s výraznou vůní. Silice jsou u různých rostlin obsaženy v různých částech těla.

Ovocné silice se v případě ovocných stromů nejčastěji získávají z plodů, v případě okrasných květů se silice vyskytují nejčastěji v květu, u bylin používaných jako koření v semenech a plodech, případně v kvetoucích stoncích. V případě dřevin, jako je například cedr, se silice získávají přímo ze dřeva [11–13].

**Olejoпрыskyřice** jsou extrakty získané ze zeleniny či koření pomocí organických polárních (methanol, ethanol aj.) či nepolárních (hexan, petrolether aj.) rozpouštědel. Hlavní složkou jsou opět silice, ovšem vyskytují se i jiné látky. V některých případech jsou přítomny kromě vonných látek i látky barvící (kurkuma, paprika) nebo látky způsobující pálivost (pikantní paprika, zázvor) [4, 12, 13].

Mezi **výluhy** řadíme látky, které byly získány pomocí vyluhování (nepřesně tzv. macerací) materiálu v lihu či jiném těkavém organickém rozpouštědle. Materiál používaný pro vyluhování se nazývá droga. Jedná se nejčastěji o vysušené, či jinak k extrakci upravené přírodní suroviny (např. ovoce, zelenina, koření aj.) [4, 11, 13].

**Destiláty**, jakožto zdroj aromatických látek, se nejčastěji používají při výrobě alkoholických a nealkoholických nápojů, případně při výrobě cukrářských krémů. Mezi nejčastěji používané destiláty patří např. jahodový, ananasový, rumový nebo slivovicový [4, 13].

**Ovocné a zeleninové šťávy** se nejčastěji kombinují s vhodným destilátem a lihovým roztokem silic, nebo s roztokem aromatického komplexu a slouží nejčastěji k aromatizaci nealkoholických nápojů. Ovocné a zeleninové dřeně se naopak používají pro výrobu aromat pastovité konzistence. Častý je přídavek želírovací přísady ve formě gelu a doslazení fruktosovým či glukosovým sirupem [13].

#### **2.1.1.2 Přírodní vonné látky živočišného původu**

Vonné látky živočišného původu se v potravinářství nepoužívají, používají se prakticky výhradně pro aromatizaci kosmetických výrobků. Na rozdíl od rostlinných vonných látek není rozmanitost živočišných vonných látek taková, přesto se jedná o velmi žádané vonné složky, neboť dodávají parfémům trvanlivost. Čtyřmi hlavními zdroji živočišných vonných látek jsou pižmo, ambra, cibet a kastoreum [7, 14].

#### **2.1.2 Syntetické vonné látky**

Mezi syntetické vonné látky řadíme všechny vonné látky, které nebyly získány z přírodních zdrojů (rostlin, živočichů). Patří sem látky, které dodávají vůni shodnou s vůní získanou z přírodních zdrojů (tzv. látky přírodně identické), a látky, které vykazují vůně, jež nelze z přírodních zdrojů připravit (tzv. látky umělé). K syntéze přírodně identických látek se přistupuje zejména z důvodu její nižší finanční či technologické náročnosti oproti získávání těchto látek z přírodních zdrojů. V případě umělých látek je záměrem získat originálních a přírodně nenapodobitelných vůní [7].

Z chemického hlediska dělíme syntetické vonné látky dle přítomnosti funkčních skupin:

- Uhlovodíky
- Alkoholy
- Etery
- Aldehydy
- Ketony
- Acetaly
- Estery
- Laktony
- Fenoly
- Aromatické látky obsahující dusík a síru
- Látky s mošusovou vůní a ostatní vonné látky

### 2.1.2.1 Uhlovodíky

Uhlovodíky jsou látky obsahující pouze uhlík a vodík. Dle charakteru řetězce dělíme uhlovodíky do tří velkých skupin – alifatické, alicyklické a aromatické. Alifatické uhlovodíky tvoří kruhové řetězce, na rozdíl od uhlovodíků alicyklických. Aromatické uhlovodíky tvoří také kruhy a zároveň obsahují aromatické (benzenové) jádro [15].

Využití uhlovodíků jakožto vonných látek není příliš široké, obvykle jsou pouze vstupní surovinou pro jejich následnou výrobu. Jejich důležitou funkcí ve spojitosti s vonnými látkami je však jejich použití jako rozpouštědel. Největší význam jako vonné látky mají terpenické uhlovodíky, vyskytující se prakticky ve všech přírodních silicích. Základní jednotkou terpenických uhlovodíků je isopren [13, 15].

Příkladem vonných látek ze skupiny uhlovodíků je např. styren, limonen, difenylmethan,  $\alpha$ - a  $\beta$ -pinen aj.

### 2.1.2.2 Alkoholy

Alkoholy nazýváme organické látky obsahující ve své molekule funkční -OH skupinu. Podle počtu -OH skupin můžeme alkoholy rozdělit na jednosytné, dvojsytné, trojsytné, ... až vícesytné (tzv. polyoly). Podle druhu radikálu vzniklého odtržením -OH skupiny můžeme alkoholy dělit na primární, sekundární a terciární, a dle přítomnosti nebo naopak absence kruhu můžeme alkoholy dělit na alifatické a alicyklické. [15]

Největší význam v oblasti vonných látek mají dvojsytné alkoholy, někdy také nazývané glykoly. Jedinou látkou s více než dvěma hydroxylovými skupinami, která má význam pro vonné látky, je trojsytný glycerol. Alkoholy jsou jakožto vonné látky používány poměrně často, neboť jsou velice stabilní. Proto se často používají jako výchozí suroviny pro výrobu dalších vonných látek, jako např. esterů, aldehydů, ketonů aj. Podmínkou pro použití alkoholů jako vonných látek je jejich čistota, neboť nečistoty výrazně ovlivňují charakter a jemnost vůně [13].

Do skupiny alkoholů řadíme např. linalool, geraniol, farnesol,  $\alpha$ -amylcinnamylalkohol aj.

### 2.1.2.3 Ethers

Ethers jsou organické deriváty sloučenin s hydroxylovou funkční skupinou, kde vodík je substituován radikálem. Nejčastějším případem je navázání obou valencí kyslíku na uhlíkové atomy radikálů. V případě, že je kyslíkový atom navázán v cyklu, řadíme takovou látku mezi heterocykly. Ethers jsou poměrně nereaktivními látkami, odolné vůči kyselinám a zásadám. Nebezpečím při jejich použití jako vonné látky je jejich citlivost na kyslík, pomocí kterého se oxidují na peroxidy, které následně negativně ovlivňují vlastnosti vonných látek. Příkladem vonných etherů je např. amylbenzylether, decylmethylether, difenylether, estragol aj. [13, 15, 16].

### 2.1.2.4 Aldehydy

Aldehydy jsou organické látky obsahující ve své struktuře funkční karbonylovou skupinu  $\text{C=O}$ , která díky své vysoké reaktivitě výrazně snižuje stabilitu aldehydů. Aldehydy, stejně jako ethers, ochotně reagují s kyslíkem, což negativně ovlivňuje jejich vonný charakter. Je proto nutné je uchovávat v 50% roztoku alkoholu, nejčastěji ethanolu [13, 16].

Aldehydy patří mezi nejdůležitější vonné látky. Jejich vůně je obvykle velmi výrazná, připomínající příslušný alkohol. V přírodě se s aldehydy setkáme nejčastěji v silicích.

Při použití jako vonné látky se nejčastěji používají aldehydy s počtem uhlíků 7 až 15, nejvýznamnějšími jsou aldehydy terpenické s počtem uhlíků 10 [13].

Mezi aldehydy řadíme i „takzvané aldehydy“, což jsou látky, které neobsahují aldehydovou funkční skupinu, a přesto mají charakteristickou ovocnou vůni. Tyto aldehydy proto nazýváme vždy aldehyd + přídavné jméno příslušného ovoce. V oblasti vonných látek patří mezi nejvíce využívané  $\alpha$ -amylcinnamylaldehyd, cinnamaldehyd, citral, lilial, citronelal, vanilin, anisaldehyd aj. [13].

#### **2.1.2.5 Ketony**

Ketony, stejně jako aldehydy, obsahují karbonylovou funkční skupinu, ovšem mají na rozdíl od aldehydů obě volné vazby uhlíku obsazeny radikály (aldehydy mají na jedné z nich navázán vodík). Stejně jako aldehydy se ketony vyskytují v alifatické i alicyklické formě. Karbonylová skupina ketonů není tak reaktivní jako v případě aldehydů, a jsou proto stálejší než aldehydy [15, 16].

Ketony jsou široce využívány jako vonné látky, mimo jiné kvůli svému hojnému zastoupení v přírodních zdrojích a mezi nejpoužívanější patří benzalaceton, ethylamylketon, menthon, dibenzylketon aj. [13].

#### **2.1.2.6 Acetaly**

Acetaly patří mezi dialkoxyalkyny vznikající reakcí alkoholu s karbonylovou sloučeninou. Oproti příslušným karbonylům jsou v alkalickém prostředí stálejší a snáze odolávají vzdušnému kyslíku. Naopak při poklesu pH pod 5 dochází k jejich štěpení za vzniku příslušné karbonylové sloučeniny [15, 16].

Vůně acetalů je obvykle příjemná, ovšem slabší než u příslušné karbonylové sloučeniny. Velmi často se používají jako stabilizátory, neboť mají velmi dobré fixační vlastnosti, díky čemuž jsou vůně obsahující acetaly trvanlivější. Příkladem acetalů, používaných jako vonné látky, je např. acetal, vertacetal, citraldiethylacetal, floral aj. [13].

#### **2.1.2.7 Estery**

Estery jsou organické sloučeniny vzniklé tzv. esterifikací, tedy reakcí karboxylové kyseliny a alkoholu za vzniku charakteristické esterové vazby. Stejně jako v případě většiny organických látek se i estery vyskytují v alifatické i alicyklické formě. Estery tvoří monokarboxylové i polykarboxylové kyseliny, stejně tak monofunkční i vícefunkční alkoholy [15, 16].

Estery karboxylových kyselin jsou časté složky silic i jiných přírodních aromat. Nižší estery mají obvykle příjemnou, charakteristickou vůni. Některé estery ovšem naopak velmi výrazně nepříjemně zapáchají. Příkladem esterů používaných jako vonné látky je např. allylcinnamát, benzylacetát, butylformiát, amylpropionát aj. [13].

#### **2.1.2.8 Laktony**

Laktony jsou cyklické vnitřní estery hydroxykarboxylových kyselin, vznikající intramolekulární reakcí karboxylové funkce s příslušnou hydroxylovou skupinou. V přírodě se s laktony můžeme setkat nejčastěji v mléce nebo v tucích. Záhřevem  $\alpha$ -karboxylderivátů laktonů dochází k jejich dekarboxylaci doprovázené vznikem silně aromatických butyrolaktonů, nebo valerolaktonů. Mezi zástupce laktonů patří např. kumarin, 6-methylkumarin, dihydrokumarin,  $\gamma$ -dodekalakton, nonalakton aj. [13, 15].

### **2.1.2.9 Fenoly**

Mezi vonné látky zařazujeme v přírodě značně rozšířené fenoly s jednou nebo více hydroxylovými skupinami. Pomocí reakce zředěných alkalických hydroxidů s alkalickými kovy se dají z přírodních zdrojů poměrně snadno izolovat. Reakcí s ionty železa dochází ke vzniku barevných sloučenin zvaných chinony [13].

Příkladem fenolů, používaných jako vonné látky, je např. eugenol, isoeugenol, propenylguaethol, thymol aj.

### **2.1.2.10 Aromatické látky obsahující dusík a síru**

V potravinářství se z aromatických látek obsahující dusík setkáváme nejčastěji s deriváty pyrrolu, pyrazinu a chinoxalinu, které velmi ochotně reagují se vzdušným kyslíkem a světlem. Je proto nutné jejich uchovávání v uzavřených tmavých prostorech. Příkladem těchto látek je např. cinnamylnitřil, geranonitřil, indol, piperidin aj [13].

S vonnými látkami obsahujícími síru se nejčastěji setkáme v aromatech některých druhů masa, zejména však v aromatech obsažených v zelenině. Sírné vonné látky mají velmi intenzivní vůni, a nejvíce se proto vyskytují ve výrazně aromatických druzích zeleniny jako např. křen, cibule, nebo hořčice. V rostlinách jsou sírné vonné látky vázány ve formě glykosidů, jejichž štěpením dochází k tvorbě sloučenin s výraznou vůní a chutí [13].

### **2.1.2.11 Látky s mošusovou vůní**

Syntetické látky s vůní mošusu se začaly vyrábět z důvodu vysoké ceny přírodního mošusu. I přesto, že výsledná vůně těchto syntetických látek je velice podobná vůni přírodního mošusu, chemické složení syntetického a přírodního mošusového aroma se často výrazně liší. Jejich společným znakem je makrocyclický kruh tvořený převážně methylenovými skupinami.

Charakteristická mošusová vůně, která je využívána převážně v parfumerii, je způsobena přítomností polárních, nejčastěji karbonylových, skupin. Mošusových vůní byla popsána celá řada, mezi zástupce patří např. mošus keton, mošus xylol, tonalid, ethylenbrasylát aj. [13].

### **2.1.2.12 Ostatní vonné látky**

Mezi ostatní vonné látky řadíme především kyslíkaté cyklické vonné látky, jako např. cineoly, maltol, ethylmaltol, furan, oxaspiran aj. [13].

## **2.2 Vonné látky s alergenními účinky**

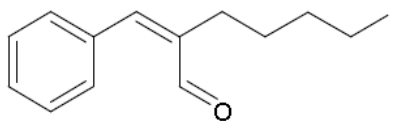
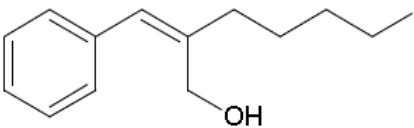
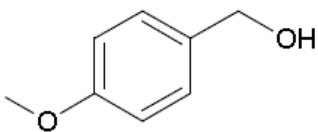
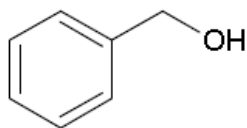
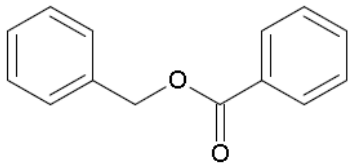
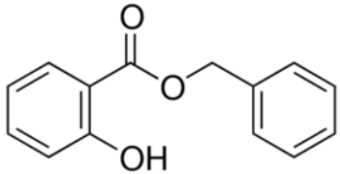
### **2.2.1 Legislativa**

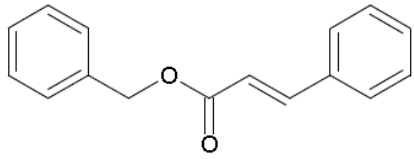
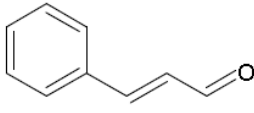
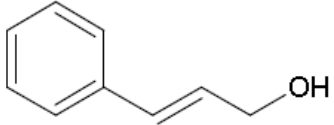
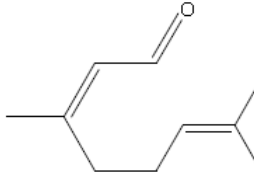
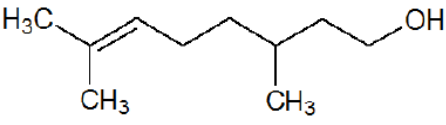
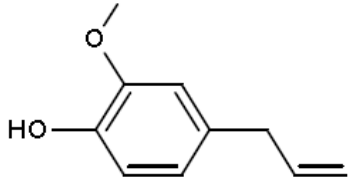
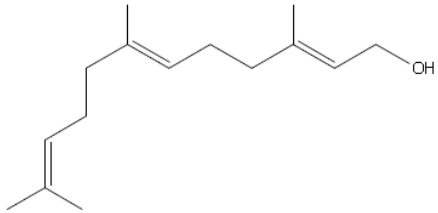
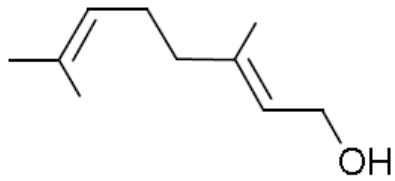
V současné době není v České republice legislativně nijak ošetřeno použití potenciálně alergenních aromatických látek (PAS – Potentially Allergenic Substances) v potravinách. Použití PASs se v České republice řídí pouze zákonem Evropské Unie z roku 2003, který vydala jako přílohu III EU Kosmetické direktivy (direktiva 2003/15/EC), který stanovuje podmínky pro použití 26 látek, které mohou mít potenciálně alergenní účinky. Z těchto 26 látek je 24 chemicky přesně definovaných a zbývajících 2 jsou mechové extrakty. Jedinou potenciálně alergenní látkou dle Kosmetické direktivy (direktiva 2003/15/EC), jejíž použití je v potravinářství limitováno, je kumarin, z důvodu jeho toxicity a podezření na karcinogenitu. Použití kumarinu je limitováno dle Nařízení 1334/2008/ES [2, 17, 19].

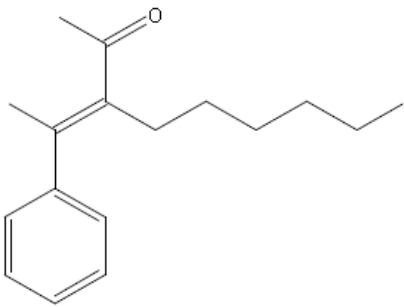
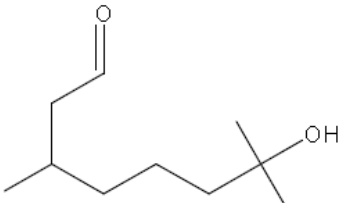
## 2.2.2 Seznam potenciálně alergenních látek

V Tabulkách 1 a 2 se nachází popis chemických, senzorických a toxikologických vlastností potenciálně alergenních vonných látek. Dále je také stručně uvedeno jejich použití v potravinářském a kosmetickém průmyslu.

**Tabulka 1** Chemické vlastnosti potenciálně alergenních vonných látek [2, 20, 21]

| Název<br>Číslo CAS                                  | Molekulová<br>hmotnost<br>[g·mol <sup>-1</sup> ] | Teplota<br>varu [°C] | Struktura   |
|---|--|----------------------|---|
| Amylcinnamal<br>[122-40-7]                          | 202,30   | 284 až 287           |     |
| Amylcinnamyl<br>alkohol<br>[101-85-9]               | 204,31   | 141 až 143           |     |
| Anýz alkohol<br>[105-13-5]                          | 138,16   | 259                  |   |
| Benzyl alkohol<br>[100-51-6]                        | 108,13   | 205                  |  |
| Benzylester<br>kyseliny benzoové<br>[120-51-4]      | 212,26   | 323                  |   |
| Benzylester<br>kyseliny<br>salicylové<br>[118-58-1] | 228,26   | 320                  |   |

|   |        |               |  |
|---|--------|---------------|--|
| Benzylester<br>kyseliny skořicové<br>[103-41-3] | 238,28 | 195 až 200    |    |
| Cinnamal<br>[104-55-2]                          | 132,16 | 246           |    |
| Cinnamyl alkohol<br>[104-54-1]                  | 134,18 | 250           |    |
| Citral<br>[5392-40-5]                           | 152,24 | 229           |    |
| Citronellol<br>[106-22-9]                       | 156,27 | 222 až 225    |   |
| Eugenol<br>[97-53-0]                            | 164,21 | 254           |  |
| Farnesol<br>[4602-84-0]                         | 222,37 | 149 (4 mm Hg) |  |
| Geraniol<br>[106-24-1]                          | 154,25 | 229           |  |

|                                  |        |     |  |
|----------------------------------|--------|-----|--|
| Hexylcinnamal<br>[101-86-0]      | 216,35 | 308 |  |
| Hydroxycitronellal<br>[107-75-5] | 170,25 | 241 |  |

**Tabulka 2** Vlastnosti a použití potenciálně alergenních vonných látek [18, 19, 22]

| Název                | Vlastnosti  | Použití a výskyt v přírodě  |
|----------------------|---|---|
| Amylcinnamal         | Žlutá kapalina s výraznou květinovou vůní připomínající jasmín.   | V potravinářství se používá jako ochucovadlo v cukrovinkách (např. žvýkačky) nebo pečivu. Často je nositelem aroma v kosmetických výrobcích s jasmínovou vůní.  |
| Amylcinnamyl alkohol | Bezbarvá až slabě žlutá kapalina s ovocnou vůní a jemnou květinovou chutí.  | Využíván je především v kosmetice. V potravinářství se používá jako ochucovadlo v aromatizovaných čajích a cukrovinkách.  |
| Anýz alkohol         | V kapalném skupenství bezbarvá až mírně nažloutlá, v pevném skupenství bílá krystalická látka s mírně sladkou vůní. | Používá se při výrobě pudingu nebo želatiny, případně mléčných dezertů a měkkých cukrovinek. V přírodě se vyskytuje zejména v rostlině <i>Pimpinella anisum</i> , dále také v medu nebo v rajčatech.  |
| Benzyl alkohol       | Bezbarvá průhledná kapalina s příjemnou mandlovou vůní.   | Využíván jako ochucovadlo ve žvýkačkách nebo ovocných nápojích. Díky svým vlastnostem je používán i ve farmaceutickém průmyslu např. jako součást sirupů proti kašli. V přírodě se vyskytuje např. v meruňkách, pivu, mandlích, sýru Cheddar nebo banánech. |



|                                 |   |   |
|---------------------------------|---|---|
| Benzylester kyseliny benzoové   | V kapalném skupenství bezbarvá kapalina připomínající olej. V pevném skupenství tvoří barevné krystaly. Je nositelem příjemné mandlovo-balzamické vůně. | V potravinářství se používá jako stabilizátor umělých aromat. Větší využití má v kosmetice jako součást balzámů. Dále se používá v insekticidech.   |
| Benzylester kyseliny salicylové | Slabě narůžovělá kapalina s příjemnou sladkou vůní.   | Většina využití v kosmetickém průmyslu. Používá se především jako fixativum jiných vonných látek.   |
| Benzylester kyseliny skořicové  | Bezbarvá až nažloutlá krystalická látka se sladkou vůní připomínající květy a plody třešní.   | Používá se prakticky výhradně v kosmetickém průmyslu jako součást sladkých, těžkých aromat. Je součástí peruánského a toskánského balzámu.  |
| Cinnamal                        | Průhledná žlutá kapalina s výraznou skořicovou vůní.  | V potravinářském průmyslu se používá jako součást kořeních přípravků. V kosmetice se využívá jako zvýrazňovač chuti např. v ústní vodě nebo zubní pastě. Je přítomna v řadě přírodních zdrojů např. ve skořicových silicích, v hřebíčku či borůvkách. |
| Cinnamyl alkohol                | Bezbarvá krystalická látka s příjemnou květinovou až skořicovou vůní a hořkou chutí.  | Využívá se především v kosmetice např. jako součást peruánského balzámu.  |
| Citral                          | Světle žlutá kapalina připomínající olej s příjemnou citrónovou vůní a nahořklou chutí.   | Používá se jako součást citrusových silic a citrusových olejů. Vyskytuje se i jako součást aromatizovaných čajů, případně v kosmetických výrobcích. V přírodě se nejčastěji vyskytuje v kůře citrusů (citrón, pomeranč).                              |
| Citronellol                     | Světle žlutá kapalina připomínající olej s nasládlou květinovou vůní s lehkým náznakem citrusů.   | Jedná se o nejpoužívanější aromatickou látku v parfumerii. V potravinářství se využívá zejména k ochucování nápojů. Je přítomen v různých rostlinných olejích (růžový, citronellový, geraniový) a exotických nápojích.                                |

|                    |   |  |
|--------------------|---|--|
| Eugenol            | Bezbarvá až slabě žlutá kapalina se silnou vůní připomínající hřebíček.         | Často používán v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu díky svým antiseptickým a antibakteriálním vlastnostem. V potravinářství se používá jako koření (je hlavní silicí v tzv. novém koření). V přírodě se vyskytuje zejména v hřebíčkové silici. |
| Farnesol           | Bezbarvá kapalina se sladkou květinovou vůní.                                   | Využíván především v parfumerii. Přidáván jako aditivum do cigaretového tabáku. V přírodě se vyskytuje např. v květech růže, jasmínu nebo pomerančovníku.  |
| Geraniol           | Světle žlutá kapalina připomínající olej se sladkou vůní růží.                  | Díky svým antiseptickým vlastnostem je často využíván v přípravcích na kůži. V přírodě se vyskytuje ve většině silic.  |
| Hexylcinnamal      | Průhledná žlutá tekutina s jemnou květinovou vůní.                              | Používá se především v parfumerii a kosmetice. V přírodě se vyskytuje v rychle rostoucích druzích liján, ze kterých se také získává.   |
| Hydroxycitronellal | Výrazně aromatická bezbarvá kapalina s vůní připomínající lípu či konvalinku.   | V parfumerii a kosmetice se používá k zesílení květinového aroma.  |
| Isoeugenol         | Bezbarvá až světle žlutá viskózní kapalina s vůní připomínající karafiát.       | Přítomen v mnoha rostlinných a éterických olejích (např. v hřebíčkovém). Používá se ke korekci vůně v čajích nebo kořeních přípravcích.  |
| Isomethyl ionon    | Průhledná bezbarvá až žlutá kapalina s vůní růží, nebo borovicového jehličí.    | Používá se především v parfumerii. Díky své dobré mísitelnosti je součástí řady parfémových směsí.   |
| Kumarin            | Bílá krystalická látka s vůní lučního seno vzdáleně připomínající vůni vanilky. | Používá se v parfumerii jako fixativum vůně, v potravinářství se využívá k aromatizaci tabáku či alkoholických nápojů (např. polská Zubrovka).   |
| Lilial             | Bezbarvá až lehce nažloutlá olejovitá kapalina s příjemnou květinovou vůní.     | Nejčastěji využíván v kosmetickém průmyslu k výrobě mýdel a detergentů.  |

|                |   |   |
|----------------|---|---|
| Limonen        | Bezbarvá kapalina s výraznou citrusovou vůní.   | V potravinářství se používá při výrobě koření, nápojů nebo pečiva. V přírodě se nejčastěji vyskytuje v citrusech (citrón, pomeranč) a pepři.  |
| Linalool       | Bezbarvá až světle žlutá kapalina výrazně květinové vůní připomínající konvalinky.          | V kosmetickém průmyslu se používá jako součást pěnicích výrobků, jako např. pěny do koupele, šampóny nebo mýdla. V přírodě se vyskytuje v různých ovocných šťávách (mandarinková, jablečná) a v různých druzích koření (majoránka, tymián, kardamom). |
| Lylal          | Bezbarvá viskózní kapalina připomínající olej se sladkou květinovou vůní lilií nebo šeříku. | Díky své velmi dlouhé době působení se používá jako obohacovadlo parfémových směsí. V potravinářství se používá jako součást některých alkoholických nápojů   |
| Methyl-2-oktát | Bezbarvá nebo lehce nažloutlá průhledná kapalina s jemnou květinovou vůní.                  | V potravinářství používán jako součást některých aromat, např. okurkových, jahodových nebo vinných.   |

## 2.3 Použité metody a instrumentální techniky

Cílem experimentální části je ověřit opakovatelnost a reprodukovatelnost metody stanovení vonných látek s alergenními účinky, založené na mikroextrakci tuhými fázemi ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (HS-SPME-GC-MS). V této kapitole budou stručně popsány uvedené instrumentální techniky, v následující kapitole se seznámíme s nejdůležitějšími parametry validace analytických metod a způsoby jejich stanovení.

### 2.3.1 Mikroextrakce pevnou fází

Mikroextrakce pevnou fází – Solid phase microextraction – SPME je moderní, relativně jednoduchá sorpčně-desorpční technika používaná k izolaci a následnému zakoncentrování zkoumaných těkavých látek. Jedná se o tzv. solvent-free metodu, tedy metodu, při níž není potřebné použití rozpouštědla. Základním principem je expozice malého množství sorbentu, tj. extrakční fáze, nadbytkem vzorku.

Výhodou SPME je její rychlost, relativně nízká finanční náročnost díky absenci drahých organických rozpouštědel, univerzálnost pro různé druhy chromatografií a také možnost opakovaného použití křemenného vlákna [24–26].

#### 2.3.1.1 Instrumentace

Základní součástí SPME jednotky je křemenné vlákno (viz Obrázek 1) pokryté sorpční vrstvou tvořenou polymery, sloužící jako stacionární fáze. Užívané polymery můžeme rozdělit do dvou skupin: homogenní čisté polymery a porézní částice suspendované v polymeru.

V současnosti užívanými homogenními polymery jsou polydimethylsiloxan (PDMS) a polyakrylát (PA).

V případě druhé skupiny se používá Carboxen<sup>TM</sup> jakožto porézní materiál, který je suspendován v PDMS. Křemenné vlákno je spojeno s ocelovým pístem a spolu jsou umístěny v duté ocelové jehle chránící vlákno před mechanickým poškozením [5, 24–26].

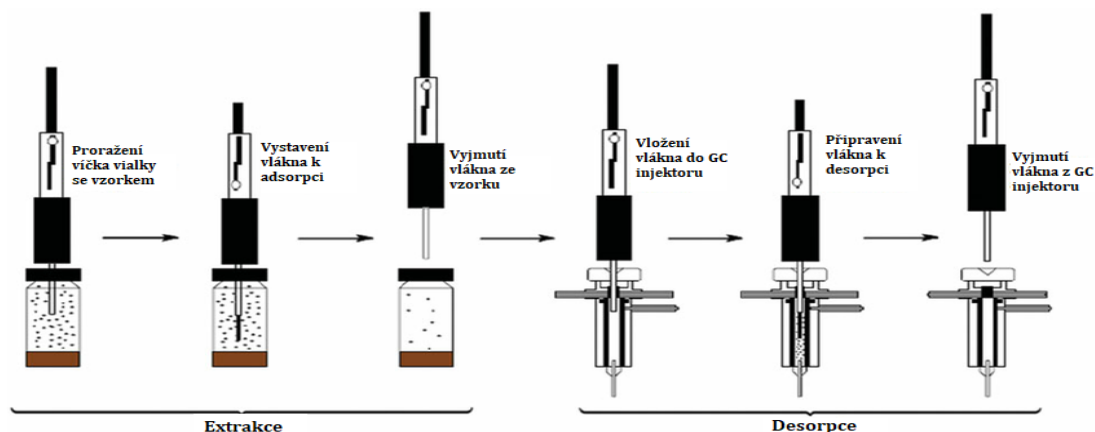


Obrázek 1 SPME vlákno

### 2.3.1.2 Princip extrakce

Při extrakci, na rozdíl od běžných extrakčních technik, není analyt odebírán v co nejvyšší možné koncentraci, ale pouze do dosažení distribuční rovnováhy mezi sorpční vrstvou a analytem. Tento rovnovážný stav je ovlivňován koncentrací analytu ve vzorku a také typem a tloušťkou polymeru v sorpční vrstvě. [25, 26].

Samotná extrakce se skládá ze dvou fází – sorpční a desorpční. Během sorpční fáze dochází k zasunutí vlákna do vzorku, v takovém případě se jedná o tzv. DI-SPME (*direct immersion* – přímé ponoření), nebo k umístění vlákna do headspace prostoru nad analytem, v takovém případě hovoříme o tzv. HS-SPME (*headspace*). Během druhé (desorpční) fáze je vlákno s nasorbovaným analytem přeneseno do analytického zařízení, v našem případě do plynového chromatografu s hmotnostním detektorem, kde dochází k desorpci a následnému stanovení. Na Obrázku 2 můžeme vidět princip extrakce pomocí HS-SPME [3, 25, 26].



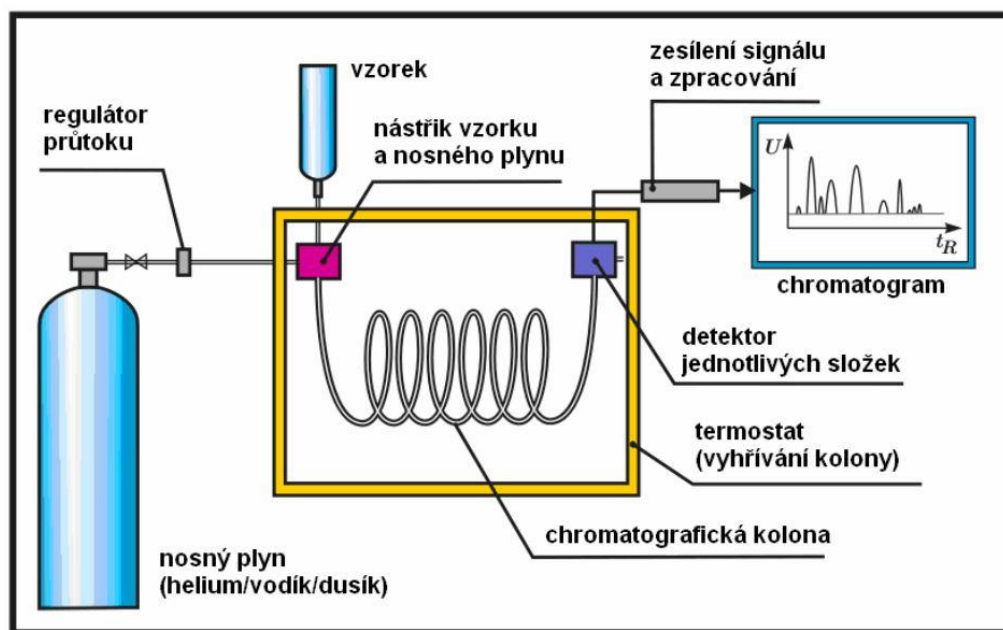
Obrázek 2 Princip HS-SPME

### 2.3.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je analytická separační metoda, založená na rovnovážném dělení zkoumaných složek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – stacionární (nepohyblivá) a mobilní (pohyblivá). Jako mobilní fáze je používán nosný plyn. Zjednodušené schéma plynového chromatografu můžeme vidět na Obrázku 3.

Plynová chromatografie se používá při analýze především organických sloučenin s bodem varu pod přibližně 400 °C, ovšem tuto metodu lze použít pro látky s bodem varu až 800 °C. Metoda je velice často využívána díky své relativní jednoduchosti, účinnosti v oddělování jednotlivých složek a možnosti analyzovat vzorky již při velice nízkých koncentracích [24, 27].

### 2.3.2.1 Instrumentace a princip GC



Obrázek 3 Schéma plynového chromatografu

Zdrojem **nosného plynu** je tlaková láhev, samotným nosným plynem je nejčastěji helium, dusík, vodík nebo argon, v závislosti na použité koloně a detektoru. Důležitým požadavkem pro nosný plyn je jeho extrémně vysoká čistota, která je pro použití v plynové chromatografii požadována min. 99,99 %. V případě potřeby je možné umístění čistícího zařízení za tlakovou láhev, které plyn vyčistí do požadované čistoty. V současnosti dodávané nosné plyny ovšem vykazují samy o sobě požadovanou čistotu, proto se s čistícím zařízením v praxi prakticky nesetkáváme [3, 24, 27].

**Regulačním systémem** je elektronické zařízení, jehož účelem je regulace průtoku nosného plynu v koloně. Tento systém umožňuje zachování konstantního průtoku nosného plynu během celého procesu separace [3].

**Injektor**, někdy také zvaný dávkovač, je zařízení sloužící k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Zavedení může být provedeno ručně, ovšem častěji se využívá automatického dávkovače, tzv. autosampleru. Dávkování vzorku je prováděno pomocí malé injekční stříkačky s jehlou skrz pryžové septum. Nástrik vzorku do kolony je možné provádět třemi způsoby, prvním je přímý nástrik, který je využíván zejména u náplňových kolon o kapacitě 1 až 10  $\mu\text{l}$ . Druhým způsobem je nástrik s děličem toku (tzv. splitter), který je umístěn mezi injektor a kolonu. Posledním způsobem je nástrik bez děliče toku, který je používán u kolon s nástrikovým objemem 0,5 až 5  $\mu\text{l}$  vzorku [3, 24].

**Kolony** patří mezi nejdůležitější součásti plynového chromatografu, neboť právě uvnitř kolon dochází k procesu separace složek obsažených ve vzorku. Kolony používané v plynové chromatografii můžeme rozdělit na dva druhy, kolony náplňové a kapilární.

V současnosti jsou více používané kolony kapilární, kvůli jejich vyšší účinnosti a stabilitě a také kvůli jejich větší inertnosti vůči separovaným složkám. Kapilární kolony jako stacionární fázi používají svoji vnitřní stěnu, nejčastěji zhotovenou z taveného křemene, skla nebo nerezové oceli. Obvyklý průměr kapilár je 50  $\mu\text{m}$ –1 mm a délka kolony 30 m [3, 28, 29].

Úkolem **termostatu** je udržení vzorku v plynném skupenství. V případě separace látek s rozdílnými body varu, umožňují termostaty měnit teplotu separace v rozmezí 50 až 400 °C. Obvyklým teplotním krokem je 5–7 °C za minutu. V případě separace látek s podobnými body varu je doporučeno použít izotermní režim, kdy je udržována konstantní teplota po celou dobu separace [3, 29].

**Detektory** jsou zařízení, která slouží k převedení fyzikálně chemické vlastnosti analytu do měřitelné podoby, nejčastěji v podobě elektrického signálu. Nosný plyn po opuštění kolony protéká detektorem, který reaguje na určitou vlastnost separovaných složek analytu a vysílá signál, který je v závislosti na čase zaznamenáván. Čas od nástřiku po vrchol zaznamenaného píku se nazývá retenční, jedná se o analytickou vlastnost, která je specifická pro jednotlivé látky a také pro jejich různé koncentrace [27–29].

Používané detektory v plynové chromatografii můžeme rozdělit do dvou skupin, na detektory destruktivní a nedestruktivní. V případě destruktivních detektorů dochází při analýze k nevratným chemickým změnám u analyzovaných látek, zatímco v případě nedestruktivních detektorů k těmto změnám nedochází. Rozdělení detektorů můžeme vidět v Tabulce 3 [27–29].

**Tabulka 3** Rozdělení detektorů používaných v GC

| Destruktivní detektory                                 | Nedestruktivní detektory               |
|--|--|
| Plamenový ionizační detektor (FID)                     | Infračervený spektrometr               |
| Plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem (AFID) | Detektor elektronového zachytu (ECD)   |
| Hmotnostní spektrometr (MS)                            | Tepelně-vodivostní detektor (TCD)      |
|  | Argonový a héliový detektor (ArD, HeD) |

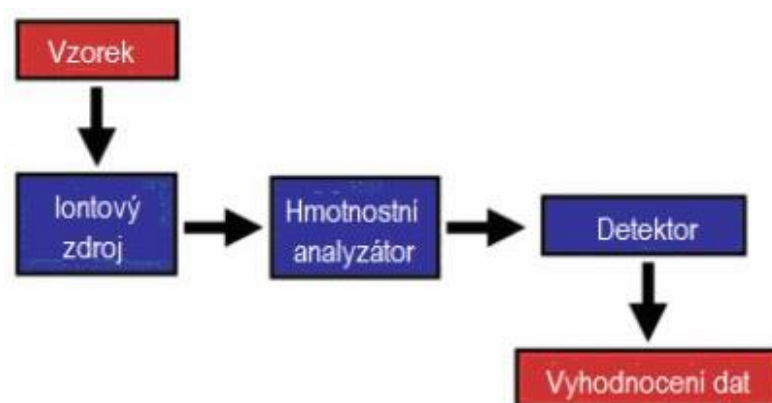
Jako **vyhodnocovací zařízení** se dnes používá výhradně počítač s příslušným softwarem, umožňující snadné odečtení a vyhodnocení retenčních časů sloužící ke kvalitativnímu vyhodnocení a výšek a ploch píků sloužící ke kvantitativnímu vyhodnocení [3].

### 2.3.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je široce využívaná fyzikálně-chemická metoda založená na separaci urychlených ionizovaných částic – iontů – ve vakuu v závislosti na jejich hmotnosti při průchodu magnetickým a elektrickým polem. Tato metoda nachází široké použití jak v kvantitativní, tak i kvalitativní analýze, kde poskytuje informace o molekulové hmotnosti a struktuře neznámých látek.

Princip metody je založen na převedení vzorku pomocí iontového zdroje na ionizovanou plynnou fázi a následné separaci vzniklých iontů v závislosti na poměru jejich hmotnosti a náboje  $m/z$  [3, 27, 30].

### 2.3.3.1 Instrumentace MS



Obrázek 4 Schéma hmotnostního spektrometru

V současnosti existuje mnoho různých způsobů provedení separace pomocí hmotnostní spektrometrie, ovšem ve všech případech jsou spektrometry složeny ze tří základních složek: iontového zdroje, analyzátoru a detektoru částic, jak můžeme vidět na Obrázku 4 [31].

Účelem **iontového zdroje** je ionizace (=tvorba iontů) procházejících částic. V závislosti na charakteru analyzovaných látek můžeme použít různé iontové zdroje, kterých je v současnosti celá řada. Používané ionizační zdroje můžeme rozdělit do dvou základních skupin, dle množství dodané energie při ionizaci, a to na tzv. tvrdé a měkké [31].

V případě použití hmotnostní spektrometrie ve spojení s plynovou chromatografií lze využít tvrdou i měkkou ionizační techniku. Zástupcem tvrdých ionizačních technik používaných při této tandemové technice je ionizace elektronová, v případě použití měkké ionizační techniky se používá ionizace chemická [3, 31].

Hmotnostní **analyzátor** je klíčovým komponentem hmotnostního spektrometru. Právě uvnitř analyzátoru dochází ve vakuovém prostředí k separaci iontů na základě jejich  $m/z$  poměru. V současnosti nejpoužívanějšími typy detektorů jsou kvadrupólový analyzátor, kvadrupólová iontová past a analyzátor doby letu (TOF). Možné je i tandemové zapojení více typů analyzátorů. [14,31].

Účelem **detektoru** je detekce separovaných iontů z hmotnostního analyzátoru. Používané detektory lze rozdělit do dvou skupin, na detektory zaznamenávající všechny separované ionty bez ohledu na jejich  $m/z$  poměr a na detektory, které jsou schopny zaznamenávat iontu i ve vztahu k jejich  $m/z$  poměru. V současnosti se jako detektor nejvíce používá elektronový násobič nebo fotonásobič, které patří do první skupiny detektorů [14, 31].

### 2.3.4 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Tandemová technika GC-MS je velice často využívána, neboť umožňuje kombinovat přednosti obou používaných metod, velmi dobrou separační schopnost plynové chromatografie a schopnost hmotnostní spektrometrie identifikovat jednotlivé separované složky.

Klíčové, při použití těchto dvou metod, je odstranit hlavní problém této tandemové techniky, a to velký rozdíl tlaků mezi plynovým chromatografem a iontovým zdrojem hmotnostního spektrometru, kdy hmotnostní spektrometr vyžaduje pro svoji práci prakticky dokonalé vakuum. Obvyklým řešením tohoto problému je instalace výkonných čerpadel, které z prostoru ionizátoru odsají nadbytečný vzduch [3, 28, 29].

## 2.4 Validace analytických metod

Validace je proces ověření použitelnosti zvolené metody pro dané účely za definovaných podmínek. Dle normy je nutné validovat metody nenormalizované, vyvinuté, rozšířené nebo modifikované. V případě převzetí již normovaných metod není provedení validace nutné. Výstupem z provedení validace je validační protokol, který obsahuje podmínky validace, její výsledky a závěr, zda je metoda vhodná k použití pro plánované účely [32, 35, 36].

### 2.4.1 Mez detekce

Mez detekce (LOD) je definována jako nejnižší možné množství látky ve vzorku, které lze použitou metodou detekovat (dokázat), ovšem látka nemusí být přesně kvantifikována [35].

Hodnota meze detekce odpovídá koncentraci, pro kterou lze analytický signál stanovované látky jasně odlišit od šumu. V případě separačních metod se mez detekce vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie [3, 36].

$$LOD = 3 \cdot \frac{h_n}{a} \quad (1)$$

$LOD$  ..... mez detekce  
 $h_n$  ..... šum na základní linii  
 $a$  ..... směrnice kalibrační přímky

### 2.4.2 Mez stanovitelnosti

Jedná se o nejnižší možné množství látky ve vzorku, které lze použitou metodou s použitelnou přesností kvantitativně vyhodnotit. V případě separačních metod se mez stanovitelnosti vyjadřuje jako desetinásobek šumu základní linie [3, 36].

$$LOQ = 10 \cdot \frac{h_n}{a} \quad (2)$$

$LOQ$  ..... mez stanovitelnosti  
 $h_n$  ..... šum na základní linii  
 $a$  ..... směrnice kalibrační přímky

### 2.4.3 Přesnost měření

Přesnost měření je definována jako těsnost shody mezi pravou hodnotou stanovované veličiny a hodnotou získanou použitím metody, jejíž validaci provádíme. Při posuzování přesnosti metody pohlížíme na měření z pohledu dvou faktorů – pravdivosti a preciznosti [35].

#### 2.4.3.1 Pravdivost měření

Pravdivost metody je těsnost aritmetického průměru (teoreticky) nekonečného počtu naměřených hodnot stanovované veličiny s referenční hodnotou [37].

#### 2.4.3.2 Preciznost měření

Preciznost metody je těsnost shody mezi naměřenými hodnotami stanovované veličiny za použití stejných, případně velmi podobných vzorků a podmínek. Preciznost sama o sobě neříká nic o správnosti naměřených hodnot. Dvěma kritérii, která zkoumáme při stanovení preciznosti metody, jsou opakovatelnost a reprodukovatelnost [35].



**Opakovatelnost** je těsnost shody mezi získanými výsledky navzájem nezávislých měření provedených v krátkém časovém úseku za podmínek opakovatelnosti, tedy za použití stejného přístroje, stejné metody, stejného vzorku, stejné laboratoře a stejného laboranta [36].

**Reprodukovatelnost** je těsnost shody mezi získanými výsledky navzájem nezávislých měření provedených v krátkém časovém úseku za podmínek reprodukovatelnosti, tedy za použití stejného vzorku a stejné metody, ovšem za použití různých přístrojů, podmínek, laboratoří i laborantů [36].

#### 2.4.4 Linearita měření

Linearita metody je definována jako schopnost zaznamenávat naměřené hodnoty, které jsou v použitém rozsahu přímo úměrné koncentraci (množství) stanovované látky ve vzorku [35].

#### 2.4.5 Robustnost měření

Robustnost lze definovat jako schopnost zkoumané metody zůstat neovlivněna drobnými, záměrnými změnami parametrů a poskytovat i při těchto změnách spolehlivé výsledky [35].

#### 2.4.6 Nejistota měření

Nejistota měření je parametr, který charakterizuje míru rozptýlení naměřených hodnot, jež mohly být původně přisuzovány k měřené veličině. Nejistota vymezuje hranice, v nichž je získaný výsledek považován za správný (=přesný a pravdivý).

Výslednou nejistotu získáme z dílčích nejistot, které se dělí na dvě složky [35]:

- Typ A (standardní nejistota) ( $u_A$ ) vychází ze statistické analýzy měření prováděných za stejných podmínek. Odhad výsledné hodnoty je roven aritmetickému průměru získaných hodnot, nejistota tohoto odhadu se zjišťuje pomocí výběrové směrodatné odchylky aritmetického průměru [3, 35].
- Typ B ( $u_B$ ) je nejistota způsobená známými, případně odhadnutelnými příčinami (nedokonalost použitého přístroje, vliv laboranta aj.). Nejistota typu B vychází z dílčích nejistot jednotlivých zdrojů a odhaduje se na základě všech dostupných informací. [3].

Pro výpočet výsledné hodnoty nazývané kombinovaná standardní nejistota se používá vztah:

$$u_C = \sqrt{u_A^2 + u_B^2} \quad (3)$$

$u_C$  ..... kombinovaná standardní nejistota

#### 2.4.7 Výťažnost

Výťažnost se definuje jako podíl (procento) získané látky vůči celkovému potenciálně získatelnému množství za definovaných podmínek. Pro stanovení výťažnosti se obvykle používá vztah [3]:

$$R = \left( \frac{Q_a}{Q} \right) \cdot 100 \% \quad (4)$$

$R$  ..... výťažnost stanovení analytu za definovaných podmínek v daném vzorku [%]

$Q_a$  ..... množství analytu stanovené analýzou

$Q$  ..... skutečné množství analytu ve vzorku

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Laboratorní vybavení a chemikálie

##### 3.1.1 Plyny

- Helium čistota 4.8, v tlakové láhvi s redukčním ventilem (SIAD, Česká republika)

##### 3.1.2 Přístroje

- Plynový chromatograf Trace<sup>TM</sup> 1310 se split/splitless injektorem (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Hmotnostní detektor ISQ<sup>TM</sup> LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Verze 2.0 (Gaithersburg, Maryland, USA)
- Analytické digitální váhy HELAGO, GR-202-EC, Itálie

##### 3.1.3 Pracovní pomůcky

- SPME-vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu$ m (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA)
- Mikropipety BiohitProline (0,5 – 1000  $\mu$ m), špičky
- Vialky o objemu 10 ml se šroubovacím magnetickým uzávěrem
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

##### 3.1.4 Chemikálie

Byly použity následující standardy alergenních vonných látek a chemikálie, všechny v čistotě p.a.

- $\alpha$ -Amylcinnamaldehyd 97 %, Sigma-Aldrich
- Anýz alkohol 98 %, Sigma-Aldrich
- Benzylalkohol 99 %, Alfa Aesar
- Cinnamaldehyd  $\geq 93$  %, SAFC Supply Solution
- Cinnamylalkohol 98 %, Alfa Aesar
- Citral, cis + trans 95 %, Alfa Aesar
- Citronellol 96 %, Alfa Aesar
- Kumarin 98 %, Alfa Aesar
- Eugenol 99 %, Alfa Aesar
- Geraniol 97 %, Alfa Aesar
- $\alpha$ -Hexylcinnamal  $\geq 95$  %, SAFC Supply Solution
- 7-Hydroxycitronellal  $\geq 95$  %, Fluka Analytical
- Isoeugenol 98 %, Alfa Aesar
- Limonen 97 %, Alfa Aesar
- Linalool 97 %, Alfa Aesar
- Methanol 99,5 %, Lach-Ner

#### 3.2 Analyzované vzorky

Ke stanovení reprodukovatelnosti a opakovatelnosti použité metody byl použit vzorek kandytových cukrovinek s jahodovou příchutí, zakoupených v běžné obchodní síti, které byly až do doby analýzy i po dobu měření uchovávány v lednici při teplotách pod 7 °C.

### 3.3 Použité metody a experimentální postupy

#### 3.3.1 Metoda HS-SPME-GC-MS

Pro stanovení aromaticky aktivních látek (se zaměřením na potenciálně alergenní látky) ve vzorcích byla použita metoda HS-SPME-GC/MS. Vzorky cukrovinek byly ve třecí misce nadrceny na malé kousky (o velikosti cca 1–3 mm) a přibližně 3 g vzorku byly naváženy do vialek o objemu 10 ml (viz Obrázek 5). Vialky byly umístěny do autosampleru pro analýzu.



**Obrázek 5** Vzorky připraveny k analýze

V případě měření standardů byly kvůli snazšímu odlišení látek s blízkými retenčními časy připraveny dvě směsi, jež byly pro měření použity. Vzorky standardů (koncentrace standardů ve směsi jsou uvedeny v Tabulce 4; koncentrace byly zvoleny tak, aby tvořily optimální pík na chromatogramu) byly odpipetovány do vialky o objemu 40 ml a doplněny methanolem do objemu 35 ml. Z takto připraveného roztoku byly do vialek o objemu 10 ml odpipetovány 3 ml a vialky vloženy do autosampleru pro analýzu.

**Tabulka 4** Koncentrace standardů použitých pro analýzu

| Alergen            | Koncentrace standardů<br>použitých pro analýzu<br>[mg·ml <sup>-1</sup> ; μl·ml <sup>-1</sup> ] |
|--------------------|--|
| Citral             | 1,43·10 <sup>-2</sup> μl·ml <sup>-1</sup>  |
| Geraniol           | 1,43·10 <sup>-2</sup> μl·ml <sup>-1</sup>  |
| Hydroxycitronellal | 5,71·10 <sup>-2</sup> μl·ml <sup>-1</sup>  |
| Eugenol            | 1,43·10 <sup>-2</sup> μl·ml <sup>-1</sup>  |
| Isoeugenol         | 9,41 mg·ml <sup>-1</sup>   |
| Amylcinnamal       | 1,43·10 <sup>-2</sup> μl·ml <sup>-1</sup>  |
| Anisalkohol        | 1,77 mg·ml <sup>-1</sup>   |
| Cinnamylalkohol    | 1,82 mg·ml <sup>-1</sup>   |

|                  |  |
|------------------|--|
| Hexylcinnamal    | 8,17 mg·ml <sup>-1</sup>                   |
| Benzylsalicylát  | 3,19 mg·ml <sup>-1</sup>                   |
| Benzylcinnamát   | 106,29 mg·ml <sup>-1</sup>                 |
| Limonen          | 1,43·10 <sup>-2</sup> µl·ml <sup>-1</sup>  |
| Linalool         | 1,43·10 <sup>-2</sup> µl·ml <sup>-1</sup>  |
| Methyl-2-oktynát | 1,43·10 <sup>-2</sup> µl·ml <sup>-1</sup>  |
| Citronellol      | 10,01·10 <sup>-2</sup> µl·ml <sup>-1</sup> |
| Benzylakohol     | 1,43·10 <sup>-2</sup> µl·ml <sup>-1</sup>  |
| Cinnamaldehyd    | 1,43·10 <sup>-2</sup> µl·ml <sup>-1</sup>  |
| Kumarin          | 10,11 mg·ml <sup>-1</sup>                  |

### 3.3.1.1 Podmínky SPME extrakce

- Doba inkubace (temperování): 10 minut
- Doba extrakce: 20 minut
- Teplota extrakce a inkubace (teplota agitátoru): 40 °C
- Agitátor zapnutý: 5 sekund, vypnutý: 60 sekund
- Množství vzorku: 3 g
- Hloubka ponoření vlákna do vialky: 20 mm

### 3.3.1.2 Podmínky GC-MS analýzy

- Kapilární kolona TG-WaxMS (30 m × 0,25 mm × 0,5 µm)
- Teplota injektoru (desorpce): 240 °C
- Doba desorpce: 20 minut
- Dávkování: splitless, ventil uzavřen: 10 minut
- Hloubka ponoření vlákna do injektoru: 40 mm
- Nosný plyn: helium, průtok: 1 ml·min<sup>-1</sup>
- Teplotní program: 40 °C s výdrží 1 min., vzestupný gradient: 5 °C/min do 220 °C s výdrží 22 min., celková doba analýzy: 60 minut
- Hmotnostní detektor v modu EI, energie ionizačních elektronů: 70 eV, teplota iontového zdroje: 200 °C, skenovací rozsah *m/z*: 30–370 amu, rychlost skenování: 0,2 s

### 3.3.1.3 Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků HS-SPME-GC-MS analýzy

Vyextrahované těkavé (vonné) látky ve vzorcích byly identifikovány pomocí programu Xcalibur 2.2 (Thermo Scientific Inc, Waltham, MA, USA) na základě srovnání získaných hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter. Potenciálně alergenní látky byly navíc potvrzeny porovnáním retenčních časů s retenčními časy získanými při měření standardů. Každý standard/vzorek byl analyzován pětkrát (*n* = 5).

Získané hodnoty retenčních časů a ploch pík byly následně exportovány do programu Microsoft Office Excel 2019 a statisticky vyhodnoceny – zjištěny hodnoty aritmetického průměru, směrodatné odchylky (SMODCH) a relativní směrodatné odchylky (RSD).

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Tato práce patří do souboru prací zabývajících se aromatickými látkami v cukrovinkách se zaměřením na látky potenciálně alergenní. Cílem práce bylo ověřit opakovatelnost a reprodukovatelnost metody HS-SPME-GC-MS, která byla pro stanovení potenciálních alergenů použita. Metoda je použitelná obecně pro stanovení těkavých látek, podmínky jsou nastaveny tak, aby umožnily především zachycení všech vonných alergenů. Podmínky stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.1

Opakovatelnost/reprodukovatelnost metody byla testována jednak s roztoky standardů alergenních vonných látek a následně na vzorku kandytové cukrovinky pro ověření možného ovlivnění výsledku potravinovou maticí; v tomto případě byly identifikovány veškeré těkavé sloučeniny ve vzorku.

Byla stanovena opakovatelnost/reprodukovatelnost retenčních časů (nutná pro identifikaci) a ploch získaných píků (nutná pro kvantifikaci) sledovaných látek. Výsledky jsou přehledně vyjádřeny jako SMODCH a RSD provedených měření ( $n = 5$ ). Získané chromatogramy směsi standardů a vzorku cukrovinky jsou uvedeny v Přílohách 1–3.

### 4.1 Opakovatelnost použité metody

Opakovatelnost je schopnost metody poskytovat uspokojivé výsledky, tedy výsledky, které při opakovaném měření poskytují RSD menší než 10 %, při měření za podmínek opakovatelnosti, tedy při měření jedním laborantem v jedné laboratoři v krátkém časovém úseku za použití stejného přístroje a stejného vzorku [36].

#### 4.1.1 Opakovatelnost metody při měření standardů alergenních vonných látek

V Tabulce 5 můžeme vidět průměrné hodnoty, SMODCH a RSD retenčního času a průměrné hodnoty a RSD ploch píků získané během pěti měření standardů PAS provedených jednou osobou v rámci jednoho dne.

Při měření se standardy PAS bylo naměřeno rozmezí RSD pro retenční časy 0–0,12 %. Většina hodnot se nacházela v rozmezí 0–0,02 %, pouze limonen dosahoval hodnoty vyšší (0,12 %).

Při kvantitativním stanovení bylo zjištěno, že RSD pro plochy píků se pohybují v rozmezí 2,14–13,12 %. Pro většinu zkoumaných látek je tedy použitá metoda v rámci mezí opakovatelnosti vhodná. Hydroxycitronellal a cis-Isoeugenol jsou jediné dvě látky, pro něž hodnota RSD překročila hranici opakovatelnosti, tedy 10 %.

#### 4.1.2 Opakovatelnost metody při měření vzorků cukrovinek

Stejně jako v případě měření standardů, i v případě měření vzorků cukrovinek můžeme v tabulce (Tabulka 7) vidět, v případě retenčního času, průměrné hodnoty, SMODCH a RSD retenčních časů a v případě ploch píků průměrné hodnoty a RSD jednotlivých látek.

Měřením bylo zjištěno, že RSD retenčních časů se pohybuje v rozmezí 0,02–0,22 %. Hranice opakovatelnosti je 10 %, je tedy zřejmé, že pro kvalitativní stanovení vonných látek, a tedy i pro látky potenciálně alergenní, v cukrovinkách je metoda v rozmezí opakovatelnosti, a tedy vhodná k použití.

V případě kvantitativního stanovení, tedy při sledování ploch píků, se RSD pohybuje v rozmezí 2,64–19,95 %. Výjimku tvoří látky, které se nevyskytovaly ve všech vzorcích, a jejich statistické vyhodnocení není tak přesné, v takových případech byly hodnoty i vyšší.

## **4.2 Reprodukovatelnost použité metody**

Reprodukovatelnost metody je její schopnost poskytovat uspokojivé výsledky při opakovaném měření za podmínek reprodukovatelnosti, tedy za použití stejného vzorku a stejné metody, ovšem ve spojení s různými laboranty, laboratoři i přístroji [36].

### **4.2.1 Reprodukovatelnost metody při měření standardů alergenních vonných látek**

V Tabulce 6 můžeme vidět průměrné hodnoty, SMODCH a RSD sledovaných parametrů, tedy retenčního času a plochy píku (stejně jako v případě opakovatelnosti uváděny u plochy píku pouze průměrné hodnoty a hodnoty RSD) získané během deseti měření standardů PAS provedených více pracovníky v rozmezí přibližně dvou měsíců.

Hodnoty RSD pro kvalitativní stanovení (retenční časy) i pro kvantitativní stanovení (plochy píků) dosahovaly podobných hodnot, jako v případě měření opakovatelnosti, což bylo očekávané při použití standardů PAS. Rozmezí RSD retenčních časů bylo stanoveno na 0–0,11 %, kdy, stejně jako v případě opakovatelnosti, byla většina látek v rozmezí 0–0,03 % a jediný limonen vykazoval hodnotu vyšší (0,11 %). Pro plochy píků bylo rozmezí RSD stanoveno na 1,96–11,93 %.

### **4.2.2 Reprodukovatelnost metody při měření vzorků cukrovinek**

V rámci Tabulky 8 jsou, stejně jako v předchozích případech, uvedeny průměrné hodnoty, SMODCH a RSD sledovaných parametrů, tedy retenčního času a plochy píku (pro plochy píků opět uvedeny pouze průměrné hodnoty a RSD). Měření bylo opět provedeno více pracovníky v rozmezí přibližně dvou měsíců.

V rámci reprodukovatelnosti se hodnoty RSD retenčních časů pohybovaly v rozmezí 0,02–0,32 %. Bylo tedy dokázáno, že metoda je vhodná ke kvalitativnímu stanovení vonných látek, tedy i látek potenciálně alergenních i v případě použití v rámci reprodukovatelnosti, tedy při různých podmínkách měření.

V případě ploch píků se RSD pohybovaly v rozmezí 5,58–36,25 %. Tyto hodnoty jsou poměrně vysoké, což pravděpodobně souvisí s těkavostí jednotlivých vonných látek, jejichž koncentrace v připravených vzorcích se s postupem času měnila. Mimo tyto hodnoty jsou, stejně jako v případě opakovatelnosti, látky, které se nevyskytovaly ve všech vzorcích.

**Tabulka 5** Naměřené hodnoty při stanovení opakovatelnosti za použití standardů alergenních vonných látek

| Alergen            | Retenční čas [min] |        |        | Plocha píku [-] |         |
|--------------------|--------------------|--------|--------|-----------------|---------|
|                    | Průměr             | SMODCH | RSD    | Průměr          | RSD     |
| Limonen            | 10,05              | 0,01   | 0,12 % | 5762846800      | 2,14 %  |
| Linalool           | 19,13              | < 0,01 | 0,02 % | 607388663       | 7,57 %  |
| Methyl-2-oktynát   | 21,71              | < 0,01 | 0,02 % | 384226587       | 9,83 %  |
| cis-Citral         | 22,53              | 0      | 0,00 % | 58322818        | 8,19 %  |
| trans-Citral       | 23,68              | 0      | 0,00 % | 74231376        | 5,60 %  |
| Citranellol        | 24,26              | < 0,01 | 0,02 % | 187889433       | 4,45 %  |
| Geraniol           | 26,06              | < 0,01 | 0,00 % | 43454854        | 5,71 %  |
| Benzylalkohol      | 26,88              | < 0,01 | 0,00 % | 953042294       | 6,22 %  |
| Hydroxycitronellal | 28,15              | 0      | 0,00 % | 2903983         | 10,16 % |
| Cinnamaldehyd      | 30,38              | < 0,01 | 0,02 % | 596394257       | 7,57 %  |
| Cinnamylalkohol 1  | 31,48              | 0      | 0,00 % | 10916712        | 3,45 %  |
| Eugenol            | 32,68              | 0      | 0,00 % | 93097230        | 5,94 %  |
| cis-Isoeugenol     | 34,33              | < 0,01 | 0,01 % | 615496892       | 13,12 % |
| Anisalkohol        | 34,74              | 0      | 0,00 % | 232883752       | 4,98 %  |
| Cinnamylalkohol 2  | 34,83              | 0      | 0,00 % | 124677601       | 7,24 %  |
| trans-Isoeugenol   | 35,98              | < 0,01 | 0,01 % | 2412473017      | 4,38 %  |
| Hexylcinnamal      | 36,13              | < 0,01 | 0,01 % | 1240576014      | 5,39 %  |
| Kumarin            | 38,07              | 0,01   | 0,02 % | 220264623       | 6,53 %  |
| Benzylcinnamát     | 41,58              | < 0,01 | 0,01 % | 100963154       | 4,33 %  |
| Benzylsalicylát    | 46,65              | 0,01   | 0,02 % | 32207192        | 4,70 %  |

**Tabulka 6** Naměřené hodnoty při stanovení reprodukovatelnosti za použití standardů alergenních vonných látek

| Alergen            | Retenční čas [min] |        |        | Plocha píku [-] |         |
|--------------------|--------------------|--------|--------|-----------------|---------|
|                    | Průměr             | SMODCH | RSD    | Průměr          | RSD     |
| Limonen            | 10,05              | 0,01   | 0,11 % | 5764899602      | 1,96 %  |
| Linalool           | 19,13              | 0,01   | 0,03 % | 582625337       | 11,93 % |
| Methyl-2-oktynát   | 21,72              | 0,01   | 0,03 % | 375046490       | 10,70 % |
| cis-Citral         | 22,53              | 0      | 0,00 % | 59722895        | 9,89 %  |
| trans-Citral       | 23,68              | 0      | 0,00 % | 73561376        | 5,75 %  |
| Citranellol        | 24,26              | 0,01   | 0,03 % | 183049740       | 7,23 %  |
| Geraniol           | 26,06              | < 0,01 | 0,00 % | 43254854        | 4,66 %  |
| Benzylalkohol      | 26,88              | < 0,01 | 0,01 % | 942529215       | 6,26 %  |
| Hydroxycitronellal | 28,15              | 0      | 0,00 % | 2835360         | 9,03 %  |
| Cinnamaldehyd      | 30,39              | 0,01   | 0,02 % | 590946778       | 7,28 %  |
| Cinnamylalkohol 1  | 31,48              | 0      | 0,00 % | 10816712        | 3,06 %  |
| Eugenol            | 32,68              | 0,01   | 0,02 % | 104107072       | 7,43 %  |
| cis-Isoeugenol     | 34,33              | < 0,01 | 0,01 % | 594496892       | 10,97 % |
| Anisalkohol        | 34,74              | 0      | 0,00 % | 230724752       | 5,29 %  |
| Cinnamylalkohol 2  | 34,83              | 0      | 0,00 % | 125677601       | 8,67 %  |
| trans-Isoeugenol   | 35,98              | < 0,01 | 0,01 % | 2482473017      | 5,57 %  |
| Hexylcinnamal      | 36,13              | < 0,01 | 0,01 % | 1320576014      | 11,42 % |
| Kumarin            | 38,07              | 0,01   | 0,02 % | 217756350       | 6,56 %  |
| Benzylcinnamát     | 41,59              | < 0,01 | 0,01 % | 103962514       | 5,83 %  |
| Benzylsalicylát    | 46,66              | 0,01   | 0,02 % | 32157192        | 4,28 %  |



**Tabulka 7** Naměřené hodnoty při stanovení opakovatelnosti za použití vzorků cukrovinek

| Látka                         | Retenční čas [min] |        |        | Plocha píku [-] |         |
|-------------------------------|--------------------|--------|--------|-----------------|---------|
|                               | Průměr             | SMODCH | RSD    | Průměr          | RSD     |
| Methyl 2-methylbutyrát        | 5,43               | 0,01   | 0,22 % | 812713382       | 14,67 % |
| Ethyl 2-methylbutyrát         | 6,34               | 0,01   | 0,13 % | 1021076156      | 12,32 % |
| Dekamethylcyklopentasiloxan   | 7,82               | 0,01   | 0,13 % | 232952821       | 11,25 % |
| Isoamyl acetát                | 8,06               | 0,01   | 0,13 % | 340031557       | 14,60 % |
| <b>Limonen</b>                | 10,01              | 0,01   | 0,10 % | 88113221        | 4,38 %  |
| Ethylhexanoát                 | 11,01              | < 0,01 | 0,04 % | 9884243563      | 13,55 % |
| Dodekamethylcyklopentasiloxan | 12,18              | < 0,01 | 0,04 % | 563414414       | 14,77 % |
| 3-hexen-1-ol acetát*          | 13,25              | 0      | 0,00 % | 250831689       | 2,64 %  |
| 4-hexen-1-ol acetát*          | 13,24              | 0      | 0,00 % | 304720412       | 22,79 % |
| Ethylheptanoát                | 13,66              | < 0,01 | 0,04 % | 5367450021      | 16,24 % |
| Ethyl (S)-(-)-laktát          | 13,99              | < 0,01 | 0,03 % | 2535441786      | 4,45 %  |
| Hexanol                       | 14,13              | < 0,01 | 0,03 % | 58995537        | 13,47 % |
| Trans-3-hexen-1-ol            | 14,45              | < 0,01 | 0,03 % | 191687391       | 10,31 % |
| Cis-3-hexen-1-ol              | 15,05              | < 0,01 | 0,03 % | 8749996588      | 6,94 %  |
| Ethyl 2-methyloktanoát        | 16,00              | 0      | 0,00 % | 187041544       | 14,07 % |
| Ethyl 2-hydroxyisovalerát     | 16,16              | < 0,01 | 0,02 % | 55152106        | 12,06 % |
| Ethyloktanoát                 | 16,34              | 0,01   | 0,05 % | 9303936022      | 10,50 % |
| (3-methyl-2-butenyl) benzen   | 16,98              | < 0,01 | 0,03 % | 104574995       | 15,35 % |
| <b>Furfural**</b>             | 17,33              | 0      | 0,00 % | 28207308        | 0,00 %  |
| Cis-3-henexyl isovalerát      | 17,66              | < 0,01 | 0,02 % | 85128551        | 15,30 % |
| Ethyl nonanoát                | 18,92              | < 0,01 | 0,02 % | 12046124826     | 6,86 %  |
| <b>Linalool</b>               | 19,17              | < 0,01 | 0,03 % | 8526562007      | 8,70 %  |
| Propylen glykol               | 20,30              | 0,01   | 0,04 % | 803698097       | 16,94 % |
| Hexyl hexanoát                | 20,68              | < 0,01 | 0,02 % | 6268677078      | 5,11 %  |
| Menthol                       | 21,43              | < 0,01 | 0,02 % | 351112681       | 7,15 %  |
| Cis-3-hexenyl hexanoát        | 21,76              | < 0,01 | 0,02 % | 808051834       | 6,42 %  |

|                             |       |        |        |            |         |
|-----------------------------|-------|--------|--------|------------|---------|
| 2-furanmethanol*            | 22,01 | < 0,01 | 0,02 % | 488538107  | 15,30 % |
| 3-furanmethanol**           | 22,02 | 0      | 0,00 % | 440318512  | 0,00 %  |
| $\alpha$ -terpineol*        | 22,80 | 0,01   | 0,04 % | 44001297   | 15,04 % |
| Gardenol                    | 23,00 | 0,01   | 0,03 % | 6889365697 | 8,55 %  |
| Benzyl acetát               | 23,64 | 0,01   | 0,03 % | 130140272  | 13,26 % |
| Cis-3-hexenyl heptanoát     | 24,03 | 0,01   | 0,02 % | 44631962   | 3,34 %  |
| Cyklohexyl 4-ethylbenzoát** | 24,03 | 0      | 0,00 % | 70418787   | 0,00 %  |
| Cis-3-hexenyllaktát*        | 24,57 | < 0,01 | 0,02 % | 1106152950 | 7,92 %  |
| Fenylethanol                | 25,47 | 0,01   | 0,03 % | 121130482  | 9,93 %  |
| Fenethyl acetát             | 25,57 | < 0,01 | 0,02 % | 2238047852 | 7,71 %  |
| Ethyl laurát                | 25,91 | 0,01   | 0,04 % | 329283481  | 8,81 %  |
| Cis-3-hexanyl n-oktanoát    | 26,23 | 0,01   | 0,03 % | 187589345  | 8,87 %  |
| 2-methylkapronová kyselina  | 26,65 | 0,01   | 0,03 % | 5513729851 | 8,06 %  |
| Fenethyl alkohol            | 27,61 | 0,01   | 0,03 % | 195414745  | 7,13 %  |
| Fenethyl 2-methylbutyrát    | 29,16 | 0,01   | 0,03 % | 1127997339 | 4,87 %  |
| Furaneol                    | 30,06 | 0,01   | 0,02 % | 678004261  | 8,10 %  |
| Kyselina oktanová           | 30,61 | 0,01   | 0,03 % | 1215762641 | 17,79 % |
| Glycerol 1,2-diacetát**     | 30,76 | 0      | 0,00 % | 258964078  | 0,00 %  |
| (E)-methyl cinnamát         | 31,03 | 0,01   | 0,03 % | 8302645367 | 2,81 %  |
| $\gamma$ -dekalakton        | 32,32 | 0,01   | 0,02 % | 2285287392 | 8,63 %  |
| Methyl anthranilát          | 34,10 | 0,01   | 0,02 % | 3880109632 | 3,19 %  |
| <b>Hexylcinnamal</b>        | 36,12 | 0,01   | 0,02 % | 28814090   | 16,75 % |
| $\delta$ -Dodekalakton**    | 37,34 | 0      | 0,00 % | 24119232   | 0,00 %  |
| <b>Kumarin</b>              | 38,07 | 0,01   | 0,02 % | 38048903   | 19,95 % |

\*látky, které se nevyskytovaly ve všech vzorcích a jejich statistické vyhodnocení je tedy nepřesné; \*\*látky, které se vyskytovaly pouze v jednom vzorku a jejich statistické vyhodnocení je tedy nemožné; SMODCH – směrodatné odchylnka; RSD – relativní směrodatná odchylnka

**Tabulka 8** Naměřené hodnoty při stanovení reprodukovatelnosti za použití vzorků cukrovinek

| Látka                         | Retenční čas [min] |        |        | Plocha píku [-] |         |
|-------------------------------|--------------------|--------|--------|-----------------|---------|
|                               | Průměr             | SMODCH | RSD    | Průměr          | RSD     |
| Ethanol                       | 4,09               | 0,01   | 0,20 % | 1611115903      | 8,27 %  |
| Methyl 2-methylbutyrát        | 5,45               | 0,02   | 0,32 % | 795352893       | 26,42 % |
| Chloroform**                  | 5,76               | 0      | 0,00 % | 100902828       | 0,00 %  |
| Ethyl 2-methylbutyrát         | 6,35               | 0,02   | 0,26 % | 1037877716      | 27,68 % |
| Dekamethylcyklopentasiloxan   | 7,83               | 0,02   | 0,21 % | 219860772       | 36,25 % |
| Isoamyl acetát                | 8,07               | 0,02   | 0,22 % | 367033263       | 18,71 % |
| <b>Limonen</b>                | 10,03              | 0,02   | 0,20 % | 89223517        | 5,58 %  |
| Ethylhexanoát                 | 11,03              | < 0,01 | 0,29 % | 10474772583     | 23,26 % |
| Dodekamethylcyklopentasiloxan | 12,20              | 0,02   | 0,18 % | 507632995       | 30,91 % |
| 3-hexen-1-ol acetát*          | 13,27              | 0,02   | 0,15 % | 346676817       | 50,35 % |
| 4-hexen-1-ol acetát*          | 13,25              | 0,01   | 0,10 % | 325521509       | 21,54 % |
| Ethylheptanoát                | 13,67              | 0,02   | 0,17 % | 5547927215      | 19,03 % |
| Ethyl (S)-(-)-laktát          | 14,01              | 0,02   | 0,17 % | 2644738894      | 23,60 % |
| Hexanol                       | 14,15              | 0,02   | 0,14 % | 64123839        | 19,57 % |
| Trans-3-hexen-1-ol            | 14,46              | 0,02   | 0,15 % | 225975973       | 37,67 % |
| Cis-3-hexen-1-ol              | 15,08              | 0,04   | 0,26 % | 9253102269      | 21,29 % |
| Ethyl 2-methyloktanoát        | 16,02              | 0,02   | 0,13 % | 186858229       | 17,36 % |
| Ethyl 2-hydroxyisovalerát     | 16,17              | 0,02   | 0,12 % | 65138123        | 34,75 % |
| Ethylloktanoát                | 16,36              | 0,03   | 0,16 % | 9285516465      | 12,26 % |
| (3-methyl-2-butenyl) benzen   | 16,99              | 0,02   | 0,12 % | 104730943       | 23,55 % |
| Isomenthone                   | 17,24              | 0,02   | 0,12 % | 13669057        | 17,65 % |
| <b>Furfural</b>               | 17,34              | 0,01   | 0,07 % | 35545128        | 18,62 % |
| Cis-3-henexyl isovalerát      | 17,68              | 0,02   | 0,12 % | 81129311        | 20,15 % |
| Ethyl nonanoát                | 18,93              | 0,02   | 0,11 % | 11629114158     | 9,44 %  |
| <b>Linalool</b>               | 19,18              | 0,02   | 0,10 % | 8677222660      | 9,79 %  |
| Propylen glykol               | 20,32              | 0,02   | 0,09 % | 704317783       | 27,44 % |

|                             |       |        |        |            |         |
|-----------------------------|-------|--------|--------|------------|---------|
| Hexyl hexanoát              | 20,69 | 0,02   | 0,09 % | 5955580841 | 10,32 % |
| Menthol                     | 21,44 | 0,02   | 0,09 % | 357116456  | 15,60 % |
| Cis-3-hexenyl hexanoát      | 21,77 | 0,02   | 0,10 % | 799392772  | 16,53 % |
| 2-furanmethanol*            | 22,02 | 0,02   | 0,09 % | 430279701  | 23,05 % |
| 3-furanmethanol**           | 22,02 | 0      | 0,00 % | 440318512  | 0,00 %  |
| <b>β-citral*</b>            | 22,56 | 0,02   | 0,08 % | 141119718  | 45,94 % |
| L-α-terpineol*              | 22,83 | 0,02   | 0,08 % | 40539554   | 38,80 % |
| α-terpineol*                | 22,80 | 0,01   | 0,04 % | 44001297   | 15,04 % |
| Gardenol                    | 23,02 | 0,02   | 0,10 % | 6986390214 | 10,56 % |
| <b>α-citral**</b>           | 23,68 | 0      | 0,00 % | 549939578  | 0,00 %  |
| Benzyl acetát*              | 23,66 | 0,02   | 0,10 % | 169913999  | 41,13 % |
| Cis-3-hexenyl heptanoát*    | 24,04 | 0,02   | 0,08 % | 38932083   | 23,89 % |
| Cyklohexyl 4-ethylbenzoát** | 24,03 | 0      | 0,00 % | 70418787   | 0,00 %  |
| Cis-3-hexenyllaktát*        | 24,58 | 0,02   | 0,09 % | 1190752764 | 25,47 % |
| Fenylethanol                | 25,49 | 0,02   | 0,08 % | 140511851  | 30,74 % |
| β-fenetyl acetát*           | 25,60 | 0,01   | 0,06 % | 2208265846 | 15,64 % |
| Fenethyl acetát             | 25,57 | < 0,01 | 0,02 % | 2236543622 | 7,04 %  |
| Ethyl laurát                | 25,92 | 0,02   | 0,08 % | 304154979  | 13,96 % |
| Geraniol**                  | 26,07 | 0      | 0,00 % | 34826562   | 0,00 %  |
| alfa isomethyl ionon**      | 26,25 | 0      | 0,00 % | 416667349  | 0,00 %  |
| Cis-3-hexanyl n-oktanoát    | 26,25 | 0,02   | 0,08 % | 183396890  | 18,29 % |
| Kyselina hexanová*          | 26,37 | 0,01   | 0,05 % | 147838101  | 20,63 % |
| 2-methylkapronová kyselina  | 26,67 | 0,02   | 0,07 % | 5491824715 | 10,60 % |
| Benzylalkohol*              | 26,94 | 0,01   | 0,02 % | 317384269  | 56,03 % |
| Fenylethyl alkohol          | 27,63 | 0,02   | 0,08 % | 220177585  | 23,65 % |
| Methyl cinnamate*           | 28,59 | 0,02   | 0,08 % | 40748157   | 57,66 % |
| Fenethyl 2-methylbutyrát    | 29,17 | 0,02   | 0,07 % | 1042763598 | 12,29 % |
| Furaneol                    | 30,08 | 0,02   | 0,06 % | 665303092  | 32,45 % |
| Kyselina oktanová           | 30,62 | 0,03   | 0,08 % | 1094234546 | 23,56 % |
| Glycerol 1,2-diacetát*      | 30,78 | 0,02   | 0,07 % | 359913845  | 49,92 % |

|                          |       |      |        |            |         |
|--------------------------|-------|------|--------|------------|---------|
| (E)-methyl cinnamát      | 31,05 | 0,02 | 0,07 % | 7888667975 | 8,92 %  |
| $\gamma$ -dekalakton     | 32,34 | 0,02 | 0,07 % | 2251257678 | 13,29 % |
| Methyl anthranilát       | 34,12 | 0,02 | 0,06 % | 3806431708 | 7,72 %  |
| <b>Hexylcinnamal*</b>    | 36,13 | 0,02 | 0,05 % | 22271833   | 32,28 % |
| $\delta$ -Dodekalakton** | 37,36 | 0,02 | 0,04 % | 19813639   | 21,73 % |
| Triethyl citrát**        | 37,85 | 0    | 0,00 % | 94499310   | 0,00 %  |
| <b>Kumarin</b>           | 38,09 | 0,02 | 0,06 % | 33068544   | 24,07 % |

*\*látky, které se nevyskytovaly ve všech vzorcích a jejich statistické vyhodnocení je tedy nepřesné; \*\*látky, které se vyskytovaly pouze v jednom vzorku a jejich statistické vyhodnocení je tedy nemožné; SMODCH – směrodatné odchylka; RSD – relativní směrodatná odchylka*

## 5. ZÁVĚR

Vonné látky se v současnosti vyskytují ve většině potravinářských výrobků, i přesto, že je snaha jejich použití omezit. Tyto látky s sebou přinášejí nejen pozitiva, jako vylepšení chuti, vůně, nebo prodloužení trvanlivosti, ale v některých případech i negativa v podobě neblahého vlivu na lidské zdraví, konkrétně mohou u některých jedinců způsobovat alergické reakce. A právě na látky, které se takto mohou projevovat, je zaměřena tato bakalářská práce.

V teoretické části se práce zabývá teoretickými poznatky o vonných látkách s důrazem na látky potenciálně alergenní (PAS). Přináší také informace ohledně metody, která se ke stanovení potenciálně alergenních látek používá, tedy metody HS-SPME-GC-MS. V neposlední řadě také shrnuje nejdůležitější kritéria zkoumaná při validaci analytické metody, což je důležitý krok při zavádění nové metody do provozu.

Na základě těchto teoretických znalostí byla v experimentální části ověřena opakovatelnost a reprodukovatelnost metody HS-SPME-GC-MS při stanovení potenciálně alergenních vonných látek ve vzorcích cukrovinek.

Z výsledků měření vyplývá, že metoda poskytuje při kvalitativním stanovení PAS velmi přesné výsledky, tedy že relativní směrodatné odchylky se pro jednotlivé látky pohybují v řádu setin procent. Konkrétně je to v případě měření se vzorky cukrovinek 0,02 až 0,22 % za podmínek opakovatelnosti a 0,02 až 0,32 % za podmínek reprodukovatelnosti. V případě použití standardů PAS byly hodnoty 0 až 0,12 %, respektive 0 až 0,11 %.

V případě kvantitativní analýzy, v tomto případě zastoupené měřením ploch píků na chromatogramu, metoda již tak přesné výsledky neposkytovala, kdy pro některé stanovené látky přesáhly hodnoty RSD hranici opakovatelnosti 10 %, a to i v případě měření se standardy PAS, kdy by měly být výsledky velice přesné. Rozmezí RSD se v tomto případě pohybovalo od 2,64 do 19,95 % v případě vzorků cukrovinek za podmínek opakovatelnosti a od 5,58 do 36,25 % za podmínek reprodukovatelnosti. Měření se standardy vykazovalo přesnější hodnoty, kdy za podmínek opakovatelnosti se RSD ploch píků pohybovaly v rozmezí 2,14 až 13,12 % a 1,96 až 11,93 % za podmínek reprodukovatelnosti.

Toto může být způsobeno použitou extrakční technikou. SPME je velmi citlivá na okolní vlivy a obecně vykazuje horší přesnost při kvantifikaci, např. díky opotřebování vlákna, což je zvláště patrné v módu HS-SPME.

Je zde také riziko těkavosti vonných látek v připravených vialkách, kdy i přesto, že byly tyto vialky velmi dobře uzavřeny a uchovány při teplotách pod 7 °C, mohlo dojít k úniku nepatrného množství těchto látek ze vzorků, což při tak nízkých koncentracích, při jakých bylo měření prováděno má poměrně výrazný vliv, zejména na SPME extrakci.

## 6. SEZNAM LITERÁRNÍCH ZDROJŮ

- [1] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS. ISBN 978-808-6659-169.
- [2] MAŇÁKOVÁ, A. *Obsah aromaticky aktivních látek v nečokoládových cukrovinkách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 83 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [3] ŠTEFKA, M. *Stanovení syntetických vonných látek v odpadních vodách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 83 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
- [4] VELÍŠEK, Jan, 1999. *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS. ISBN 80-902-3914-5.
- [5] JELÍNKOVÁ, M. *Stanovení vonných látek rostlinného původu v potravinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 79 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [6] OBRDLÍKOVÁ, B. *Stanovení vonných látek s alergenními účinky*, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 58 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [7] TREPKOVÁ, Emilie a František VONÁŠEK, 1997. *Vůně a parfémy: tajemství přitažlivosti*. Praha: Maxdorf. ISBN 80-858-0048-9.
- [8] MACHOLÁN L.: *Sekundární metabolity*, Masarykova Univerzita, Přf, Brno 1998.
- [9] BOJKOVÁ, Kateřina. *Studium fenolických kyselin a proteinového složení mouky z lupiny bílé (Lupinus albus L)* [online]. Olomouc, 2010 [cit. 2019-02-18]. Dostupné z: <<https://theses.cz/id/nravuq/>>. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Petr Tarkowski.
- [10] DVOŘÁKOVÁ, M.; VALTEROVÁ, I.; VANĚK, T. *Monoterpeny v rostlinách*. Chem. Listy 2011, 105, 839–845.
- [11] Rostlinné vonné látky. *Tech-info* [online]. 16.01.2010 [cit. 2019-03-06]. Dostupné z: <http://www.tech-info.cz/parfumerie/rostinne-latky.html>
- [12] ASCHEROVÁ, A. *Stanovení vybraných vonných látek v potravinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 87 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [13] VONÁŠEK, František, Ladislav NOVOTNÝ a Emilie TREPKOVÁ, 1987. *Látky vonné a chuťové*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 437 s.
- [14] TYLICOVÁ, P. *Syntetické vonné látky v odpadních vodách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 88 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
- [15] MCMURRY, John, 2015. *Organická chemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-7080-930-3.
- [16] MARUŠKA, Josef a Jaroslav VOKÁLEK, 1958. *Organická chemie: učební text pro 2. ročník hospodářských škol se čtyřletým studiem*. 3. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství.
- [17] Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1223/2009: ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích. Úřední věstník Evropské unie, [online] 22. 12. 2009 [cit. 2019-03-09]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:cs:PDF>

- [18] FIDRICHOVÁ, I. *Obsah alergenních vonných látek ve vybraných typech potravin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 67 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [19] PLEVOVÁ, P. *Monitoring alergenních vonných látek v potravinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 53 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [20] ChemIDplus Advanced [database online]. 1993. [cit. 2019-03-09]. Dostupné z WWW: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidheavy.jsp>
- [21] PubChem. [database online]. 2004. [cit. 2019-03-09]. Dostupný z WWW: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [22] SURBURG, Horst, Johannes PANTEN a Kurt BAUER, c2006. *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses*. 5th completely rev. and enl. ed. Weinheim: Wiley-VCH. ISBN 35-273-1315-X.
- [23] MOTÚZOVÁ, E. *Vliv aromaticky aktivních látek na senzorickou kvalitu nečokoládových cukrovinek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 112 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [24] SOMMER, Lumír, 2000. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM. ISBN 80-214-1742-0.
- [25] BÍLEK, Tomáš, 2013. *Využití GC a SPME v analýze přírodních látek*. Hradec Králové. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Fakulta farmaceutická v Hradci Králové. Vedoucí práce Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.
- [26] PAWLISZYN, Janusz, 1997. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. New York: Wiley-VCH. ISBN 04-711-9034-9.
- [27] VOLKA, Karel, 1995. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0227-8.
- [28] ŠTULÍK, Karel, 2004. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0852-9.
- [29] Gas Chromatography, *Chemistry LibreTexts* [online]. 2019 [cit. 2019-03-10]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/Gas\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography)
- [30] EL-ANEED, Anas, Aljandro COHEN a Joseph BANOUB, 2009. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*. 44(3), 210-230. DOI: 10.1080/05704920902717872. ISSN 0570-4928. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704920902717872>
- [31] FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR, Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 20 (41). 2012(3), 152-157. ISSN 1210-7921.
- [32] LOPEZ, Pedro, Ernesto BUFFONI, Fabio PEREIRA a Jose Luis VILCHEZ QUERO, 2011. Analytical Method Validation. *Wide Spectra of Quality Control*. InTech, 2011-07-07. DOI: 10.5772/21187. ISBN 978-953-307-683-6. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-quality-control/analytical-method-validation>
- [33] KOVAL, D. *Výběr a optimalizace metody stanovení volných mastných kyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 55 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.



- [34] ŘEHÁČKOVÁ, Lenka, 2015. *Validace analytické metody a její využití v preklinickém testování potenciálních léčiv*. Olomouc. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Vedoucí práce PharmDr. Lubor Urbánek, Ph.D.
- [35] KAZUSAKI, Masato, Shinji UEDA, Naoto TAKEUCHI a Yasutaka OHGAMI, Validation of analytical procedures by high-performance liquid chromatography for pharmaceutical analysis. *Chromatography*. 33. 2012(2).
- [36] BAREK, J a kol. Nomenklatura a terminologie: Metrologická terminologie v chemii. *Chemické listy*. 2000, 94(7), 439-444. ISSN 1213-7103.

## 6.1 Zdroje použitých obrázků

- [1] Obrázek 1: CHARVÁTOVÁ, Michaela, 2015. SPME vlákno. In: *FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE* [online]. [cit. 2019-03-10]. Dostupné z: <https://fvhe.vfu.cz/static/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/metoda-spme/index.html>
- [2] Obrázek 2: IFTIKHAR, Ahmed, 2015. Headspace SPME. In: *ResearchGate* [online]. [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Stepwise-method-of-operation-for-headspace-SPME-Original-image-reproduced-and-adapted\\_fig1\\_283544137](https://www.researchgate.net/figure/Stepwise-method-of-operation-for-headspace-SPME-Original-image-reproduced-and-adapted_fig1_283544137)
- [3] Obrázek 3: MAGDECHOVÁ, A. *Možnosti identifikace flavonoidů v environmentálních matricích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 50 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
- [4] Obrázek 4: ŠTEFKA, M. *Stanovení syntetických vonných látek v odpadních vodách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 83 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

|                |   |
|----------------|---|
| <b>AFID</b>    | Plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem               |
| <b>ArD</b>     | Argonový detektor   |
| <b>DI-SPME</b> | Mikroextrakce pevnou fází ze vzorku ( <i>direct immerse</i> ) |
| <b>EC</b>      | Evropská komise   |
| <b>ECD</b>     | Detektor elektronového záchytu                                |
| <b>ES</b>      | Komise Evropského společenství                                |
| <b>EU</b>      | Evropská Unie   |
| <b>FID</b>     | Plamenový ionizační detektor                                  |
| <b>GC</b>      | Plynová chromatografie  |
| <b>GC-MS</b>   | Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí                   |
| <b>HeD</b>     | Heliový detektor  |
| <b>HS-SPME</b> | Mikroextrakce pevnou fází nad vzorkem ( <i>headspace</i> )    |
| <b>LOD</b>     | Mez detekce   |
| <b>LOQ</b>     | Mez stanovení   |
| <b>MS</b>      | Hmotnostní spektrometrie                                      |
| <b>PA</b>      | Polyakrylát   |
| <b>PAS</b>     | Potenciálně alergenní látky ( <i>Potentially Allergenic</i> ) |
| <b>PDMS</b>    | Polydimethylsiloxan   |
| <b>RSD</b>     | Relativní směrodatná odchylka                                 |
| <b>SMODCH</b>  | Směrodatná odchylka   |
| <b>SPME</b>    | Mikroextrakce pevnou fází                                     |
| <b>TCD</b>     | Tepelně-vodivostní detektor                                   |
| <b>TOF</b>     | Analyzátor doby letu  |

## 8. SEZNAM PŘÍLOH

|           |  |
|-----------|--|
| Příloha 1 | Chromatogram směsi standardů potenciálně alergenních látek 1 |
| Příloha 2 | Chromatogram směsi standardů potenciálně alergenních látek 2 |
| Příloha 3 | Chromatogram těkavých látek vzorku cukrovinek                |

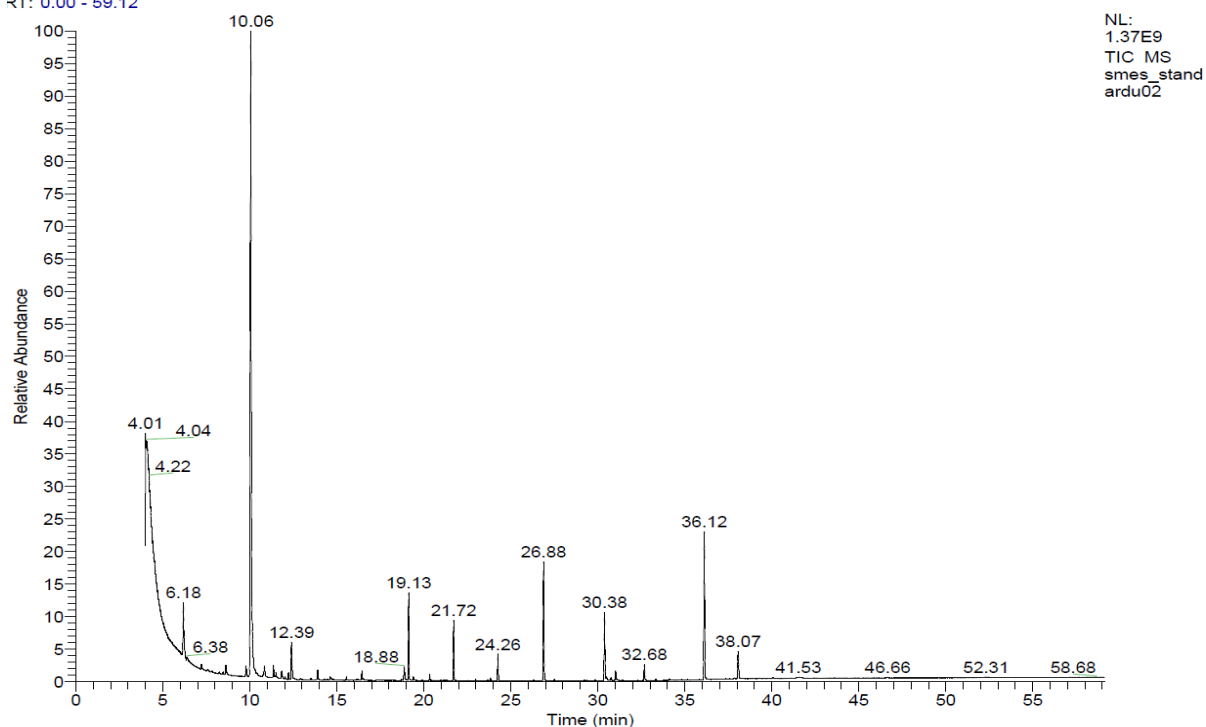
## 9. PŘÍLOHY

### Příloha 1.: Chromatogram směsi standardů potenciálně alergenních látek 1

C:\Vitoval\...ss\_1\smes\_standardu02

11/13/18 21:05:50

RT: 0.00 - 59.12

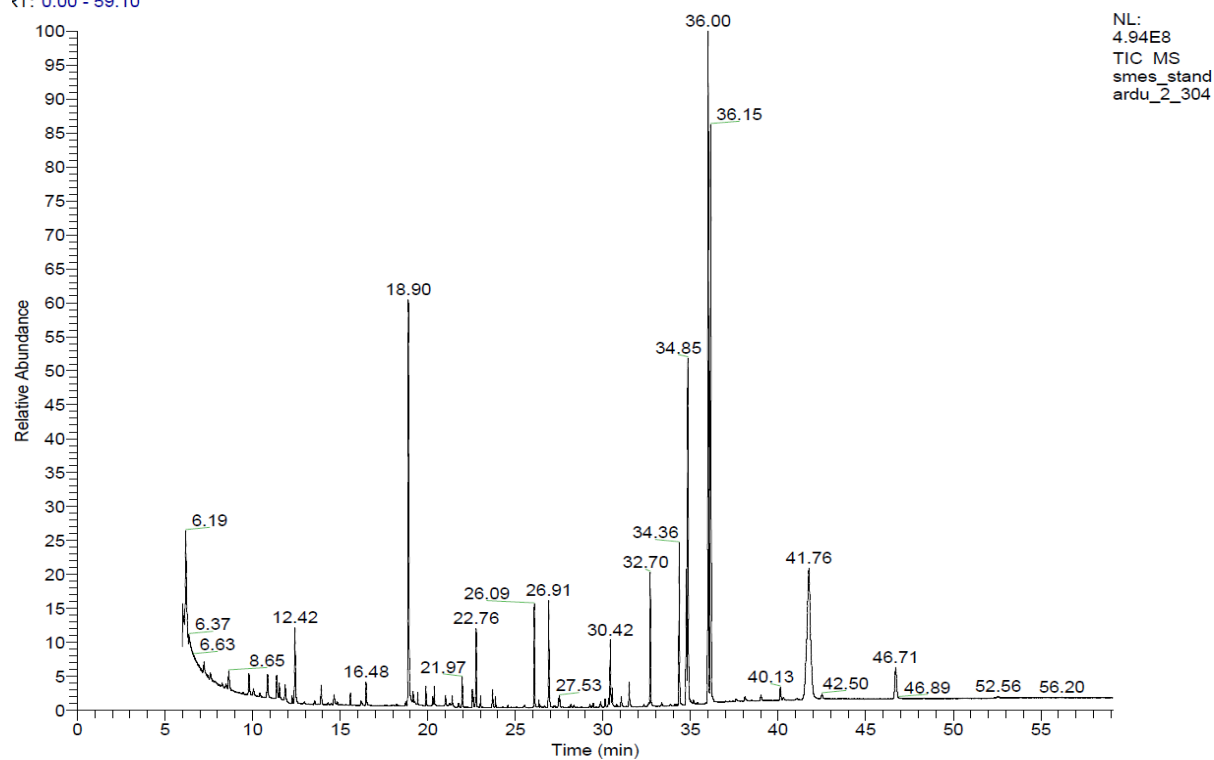


### Příloha 2.: Chromatogram směsi standardů potenciálně alergenních látek 2

C:\Vitoval\...smes\_standardu\_2\_304

12/19/18 13:41:25

RT: 0.00 - 59.10



### Příloha 3.: Chromatogram těkavých látek vzorku cukrovinek

Vzorek\_1 (16.11.; 3,0112 g)

11/16/18 09:32:24

RT: 0.00 - 59.11

